

Ph.D értekezés

Emésztőrendszeri diszfunkció és humorális immunválasz kapcsolata
IV-es típusú kollagén mutációkkal *Drosophilában*

Kiss Márton

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

Szeged

2016.

Emésztőrendszeri diszfunkció és humorális immunválasz kapcsolata
IV-es típusú kollagén mutációkkal *Drosophilában*

Ph.D. értekezés

Kiss Márton

Témavezető: Dr. Mink Mátyás egyetemi docens

SZTE TTIK Genetikai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

Szeged, 2016.

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	5
Bevezetés.....	6
Az extracelluláris mátrix felépítése	6
A kollagén szupercsalád osztályozása	7
A kollagén IV gének kromoszomális lokalizációja és a kollagén IV molekuláris szerkezete	7
A kollagén hélix tulajdonságai, kialakulása	8
A IV-es típusú kollagénből felépülő hálózatok	9
A IV-es típusú kollagén poszttranszlációs módosításai és azok létrejöttét katalizáló enzimek	10
A kollagénhez köthető betegségek	11
Az Alport-szindróma	11
A Goodpasture-szindróma	13
HANAC-szindróma	14
Walker-Warburg-szindróma (Muscle-eye-brain disease).....	14
Porenkefália	14
X-hez kötött hallásvesztés.....	14
ASD (Anterior segment dysgenesis).....	15
Célkitűzések	18
Anyagok és módszerek.....	19
<i>Drosophila</i> törzsek	19
TUNEL-jelölés	19
Mutációs helyek azonosítása	20
RNS kivonás és jelölés, microarray kísérlet, adatelemzés, qPCR.....	21
Reaktív oxigéngyökök (ROS) mennyiségének meghatározása	24
Baktériumok izolálása, 16S rRNS amplifikáció	24
Antibiotikumos kezelés, baktérium etetés, a bél határoló funkciójának vizsgálata	25
Eredmények.....	27
A hőmérséklet érzékeny <i>col4a1</i> mutációk konzervált glicin aminosavakat érintenek.....	27
A <i>col4a1</i> gén <i>DTS-L3</i> allélje sejtpusztulást okoz az L3-as stádiumú lárvák közepbelében.	30
AMP (antimikrobiális peptid) túlexpresszió a <i>col4a1</i> gén <i>DTS-L3</i> alléljét hordozó mutánsban.....	31
A microarray-kísérlet eredményeinek validálása qPCR-rel és egy transzgenikus AMP törzs segítségével.....	34

A reaktív oxigéngyökök (ROS) szintje emelkedett a mutánsban	36
A bélflóra összetétele megváltozik a hőmérsékletemelés hatására	38
Az antibiotikumos kezelés elősegíti a hosszabb túlélést	40
A túl magas telepszám végzetes restriktív hőmérsékleten	41
A <i>col4a1</i> génben bekövetkező <i>DTS-L3</i> mutáció intesztinális diszfunkciót okoz, megjelenik a „SMURF” fenotípus	44
Diszkusszió.....	47
A dolgozathoz kapcsolódó publikációk	51
Folyóiratban megjelent cikk	51
Folyóiratban megjelent előadás kivonat	51
Könyvfejezet	51
Köszönetnyilvánítás	52
Magyar nyelvű összefoglaló.....	54
Summary	58
Irodalomjegyzék.....	61
Függelék	72

Rövidítések

AMP	antimikrobiális peptid
As	aminosav
ASD	anterior segment dysgenesis
BSA	bovine serum albumin
CFU	colony forming units = csíraszám
DTS	dominant temperature sensitive
ECM	extracelluláris mátrix
EMS	etil-metán-szulfonát
FACIT	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices
GBM	glomerular basement membrane = glomeruláris alapmembrán
HANAC	Hereditary Angiopathy, Nephropathy, Aneurisms and muscle Cramps
Hyl	hidroxi-lizin
Hyp	hidroxi-prolin
Lys	lizin
Pro	prolin
ROS	reaktív oxigéngyökök
SNP	single nucleotide polymorphism

Bevezetés

Az extracelluláris mátrix felépítése

Az extracelluláris mátrix (ECM) a sejten kívüli tér makromolekuláinak rendezett hálózata, amely a sejtek migrációját, fejlődését és túlélését biztosítja, kapcsolatot teremt a sejtek között, szövevé szervezi azokat, és részt vesz kommunikációjukban. Növekedési faktorokat és citokineket köt, megszabja a sejtek polaritását és sajátos *niche*-t képez az őssejtek számára (Erickson és Couchman, 2000; Hynes, 2009; Wang és mtsai, 2008). Az ECM elsődleges szerepet tölt be a bőr, a csontok, az ízületi porcok, a vérerek és mindennemű kötőszövet szerkezetének kialakításában, így a többsejtű állati lét szinte elképzelhetetlen lenne nélküle (Boute és mtsai, 1996; Hynes, 2012; Jones és mtsai, 2007).

Az ECM egy speciális változata a bazális membrán, ami egyfajta határoló funkciót lát el. Megtalálható a bőrben: ezen ülnek a bőr epitelsejtjei; az erek falában: ehhez kötődnek az endotelsejtek; a vese glomerulusaiban, ahol a fenesztrált endotélt feszíti ki – utóbbi létfontosságú a vese, előbbi a vér-agy gát fiziológiás működése szempontjából. Jelen van a cochleában, a szaruhártyában és a szemlencsében is. A mezotéliumot (mellüreg, hasüreg, szívburok /perikardium/ membránja), a meningotéliumot, a szinóviumot részben ez alkotja. Borítja a vázizomrostokat, és tapadási felületet biztosít a simaizmok számára, megtalálható a Schwann- és a zsírsejtek körül is. Szintézisét általában az epitél-/endotelsejtek végzik, muslicában azonban elsősorban a hemociták termelik (Bosman és Stamenkovic, 2003; Bunt és mtsai, 2010). A hemociták több mint 90%-a plazmatocita, melyek a makrofágokhoz hasonló fagocitotikus szerepük mellett az extracelluláris mátrix alkotóit is szintetizálják (Martinek és mtsai, 2008). A maradék néhány százalék egyik része, a kristálysejtek speciális funkciót látnak el: a patogének elleni melanizációs reakciót katalizálják (Lebestky és mtsai, 2000), míg a kórokozó hatására differenciálódó lamellociták nagyméretű idegen testeket képesek tokba zárni (Márkus és mtsai, 2009).

A bazális membrán fajonként és szervenként rengeteg különböző molekulából állhat, felépítésében mégis oroszlánrészt vállalnak a kollagén szupercsalád tagjai. Ezeken kívül megtalálhatóak benne a lamininek, a proteoglikánok, a glükózaminoglikánok, a fibronektin, a perlekán és a nidogén (Martinek és mtsai, 2008; Sasaki és mtsai, 2004; Timpl és Brown, 1996; Timpl és mtsai, 1979).

A bazális membrán (vagy membrana basalis) két nagyobb egységre bontható: a bazális laminára és a retikuláris laminára. A bazális lamina nem-fibrilláris kollagénből, nem kollagén jellegű glikoproteinekből és proteoglikánokból áll. A retikuláris laminát proteoglikán mátrixba ágyazott fibrilláris kollagén alkotja (Sanes, 2003). A két réteget VII-es típusú kollagén kapcsolja össze (Keene és mtsai, 1987).

A kollagén szupercsalád osztályozása

„A kollagén egy nagyon érdekes fehérje” (Pauling és Corey, 1951). Kitüntetett szerepét mutatja, hogy minden ECM-ben megtalálható legalább egyféle kollagén. A kollagén szupercsaládot kilenc, különböző molekuláris szerkezetű és különböző funkciókat ellátó kollagén család alkotja (I. táblázat, Kadler és mtsai, 2007; Myllyharju és Kivirikko, 2004 alapján). Ezek mai ismereteink szerint emberben összesen 28 fajta kollagént és több, kollagénszerű doménnel rendelkező proteint foglalnak magukba (Ricard-Blum és Ruggiero, 2005; Ricard-Blum, 2011). Ezek nagy részét egy-egy gén kódolja; kivételt képez azonban a IV-es típusú kollagén, melynek hat génjét írták le emberben (*COL4A1-A6*) és kettőt *Drosophila melanogaster*-ben (*col4a1/Cg25C/Dcg1/CG4145* és *col4a2/vkg/CG16858*) (Natzle és mtsai, 1982; Yasothornsrikul és mtsai, 1997). Az egyes gének szerkezetileg és funkcionálisan nem azonosak, különbségeikről a következő fejezetekben ejtünk szót.

Vizsgálódásunk tárgya az elsőként részletesen elemzett bazális lamina alkotó, a IV-es típusú kollagén (Chung és mtsai, 1979). A IV-es típusú kollagént a hálózataalkotó kollagének közé sorolják: ez képezi az alapmembránok szerkezeti vázát, ehhez kapcsolódnak egyéb járulékos fehérjék, amiken keresztül a mátrixhoz horgonyzódnak a sejtek.

A kollagén IV gének kromoszomális lokalizációja és a kollagén IV molekuláris szerkezete

A *Drosophila melanogaster* IV-es típusú kollagéneit a *col4a1* és a *col4a2* gén kódolja. A két gén közvetlenül egymás mellett található a második kromoszóma 25C sávjában, egymáshoz „fej a fejhez” elrendezésben illeszkednek.

A kollagén molekulát az N-terminális 7S domén, a kollagén alegység és a C-terminális NC1 domén alkotja. A két, relatíve rövid terminális domén között találjuk a kollagén alegységet, ami muslicában és emberben is hozzávetőleg 1400 As-ból épül fel. Ez a szakasz Gly-X-Y ismétlődésekből áll, ahol X leggyakrabban prolint, Y pedig 4-hidroxiprolint jelent

(Ricard-Blum, 2011). Ezeken kívül találunk még lizint és ennek poszttranszlációs módosításával keletkező változatát, az 5-hidroxilizint. Jelentőségük a kollagén molekulák közötti keresztkötések kialakításában van.

<u>Kollagén család</u>	<u>Kollagén gén</u>
Fibrilláris	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
FACIT = Fibrillum asszociált, megszakított triplahélixet tartalmazó kollagének	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI
Hálózataalkotó (hexagonális)	VIII, X
Hálózataalkotó (kollagén IV típusú)	IV
Gyöngyös filamentumok	VI, XXVIII, (XXVI)
Horgonyzó fibrillumok	VII
Transzmembrán doménnel rendelkezők	XIII, XVII, XXIII, XXV
Endosztatin-képzők	XV, XVIII
Triplahelikális kollagénszerű domént tartalmazó fehérjék	C1q, adiponektin, fikolin, acetilkolin-észteráz, ektodiszplazin

I. táblázat: A kollagén szupercsalád osztályozása

A kollagén hélix tulajdonságai, kialakulása

A kollagén trimer (1.F ábra) összeszerelődése során három kollagén molekula, azaz három fehérjeszál alkot egy protomert. Az egyes fehérjék balmenetes poliprolin II típusú hélix alakban tekerednek fel; ennek jellegzetessége, hogy az α -hélixnél nyitottabb, nagyobb az egy fordulatra számolható emelkedése. A három molekulából kollagén szuperhélix áll össze, ami az egyes szálak konformációjától eltérően jobbmenetes. Az így kialakuló negyedleges struktúrát hidrogénhidak tartják össze: a Gly peptidkötésben lévő N–H csoportja és a másik kollagénszál prolinjának C=O funkciós csoportja, továbbá a Gly C=O csoportja egy vízmolekulán keresztül egy másik szál X pozícióban lévő aminosavának N–H csoportjával alakít ki kötést (Kramer és mtsai, 1999; Ramachandran és Kha, 1954).

Részletes vizsgálatok kimutatták, hogy a triplahelikális kollagén molekula összeszerelődését a C-terminális NC1 domén irányítja: itt találhatók azok a speciális

felismerőhelyek, melyek a kollagén egységek kiválasztásáért felelősek. Itt kezdődik el a proteinek egymás körüli feltekeredése, a negyedleges szerkezet kialakulása (Khoshnoodi és mtsai, 2006). A felismerőhelyeknél csak az összeillő fehérjék képesek kapcsolódni, ami megmagyarázza, hogy az elvileg lehetséges nagyszámú variáció közül *in vivo* csak három fordul elő (Boutaud és mtsai, 2000). A triplahélixek összetétele rendre $(A1)_2(A2)$, $(A3)(A4)(A5)$, illetve $(A5)_2(A6)$.

Egy érdekes különbség figyelhető meg a kollagének között. A fibrilláris kollagének gyakorlatilag tökéletes, megszakítások nélküli (folyamatos Gly-X-Y ismétlődések) triplahelikális As-láncát alapul véve a többi kollagén mind több hibahelyet tartalmaz, ami a Gly-X-Y ismétlődésekben találhatóktól eltérő aminosavak beépülését jelenti. Ezeknek fontos szerep jut molekulák közötti interakciók, kötőhelyek és a térbeli szerkezet kialakításában (Hwang és mtsai, 2010).

A IV-es típusú kollagénből felépülő hálózatok

Az említett terminális domének feladata a triplahelikális protomerek összekapcsolása is: az ezek közt létrejövő kötések teszik lehetővé az alapmembránok kollagén IV hálózatának kialakulását: négy protomer képes kapcsolódni N-terminális 7S doménjeiken keresztül. A C-terminális NC1 domének szintén alkalmasak redukálható intermolekuláris keresztkötések kialakítására két protomer hat-hat meghatározott metioninja és (hidroxil)lizinje között (Vanacore és mtsai, 2009). Az így kialakuló hálózat mintázata a drótkerítésre emlékeztet, ezért az angol nyelvű szakirodalomban a „chicken-wire” névvel illetik (Gordon és Hahn, 2010).

A IV-es típusú kollagénekből létrejövő hálózat protomer összetétele nem véletlenszerű, hanem ugyanolyan specifikus, mint az egyes protomerek szálösszetétele. A *Homo sapiens*-ben előforduló háromféle protomer ugyancsak három, különböző összetételű hálózatot alkot, noha a lehetséges kombinációk száma hét.

Az élővilágban legelterjedtebb az $(A1)_2(A2)$ - $(A1)_2(A2)$ hálózat, ami a szivacsoktól kezdődően minden állattörzsben előfordul, a legtöbb alapmembránnak alkotórésze (Leys és Riesgo, 2012). A második összetétele $(A3)(A4)(A5)$ - $(A3)(A4)(A5)$, ezekben szintén azonos protomerek képezik a szerkezet alapját. Ezzel a kombinációval a vese glomerulusaiban, a tüdőben, a herében, a cochleában illetve a szemben találkozhatunk. Ettől eltér a harmadik típus, ami a bőrben, a simaizomban, a nyelőcsőben és a Bowman-tokban fordul elő, itt

ugyanis $(A1)_2(A2) - (A5)_2(A6)$ összetételű hálózatokat találunk (Borza és mtsai, 2001). Az ember embrionális fejlődése során a vesében is az $(A1)_2(A2) - (A1)_2(A2)$ hálózat jelenik meg először. Ezt váltja az érgomolyagok alapmembránjában a $(A3)(A4)(A5) - (A3)(A4)(A5)$, a Bowman-tokban pedig beépül mellé a *COL4A5* és a *COL4A6* gén terméke, amik így együtt hozzák létre a már említett $(A1)_2(A2) - (A5)_2(A6)$ hálózatot (Boutaud és mtsai, 2000; Hudson és mtsai, 2003).

A IV-es típusú kollagén poszttranszlációs módosításai és azok létrejöttét katalizáló enzimek

A korábban említett módosított As-ak létrehozásához hidroxiláz aktivitású enzimek szükségesek, amiket prolin-, illetve lizin-hidroxilázként ismerünk. Működésükhöz molekuláris oxigént és α -ketoglutársavat igényelnek. A folyamat során az α -ketoglutársav szukcináttá alakul, míg a Pro vagy Lys As oldallánca a negyedik vagy az ötödik szénatomon egy hidroxil csoporttal egészül ki. A Hyl-ek glükóz vagy galaktóz kapcsolódásával glikozilálódhatnak is. Ezen történések az endoplazmatikus retikulumban játszódnak le.

A prolin- és lizin-hidroxiláz aktív centrumában Fe^{2+} ion foglal helyet, ami működés közben Fe^{3+} ionná oxidálódik. Az enzimek regenerációjához, azaz a Fe^{3+} ion redukálásához C-vitamin szükséges. Ha ez nincs kellő mennyiségben jelen, akkor az enzimek nem képesek hidroxilálni az oldalláncokat, nem alakul ki a fehérjék végleges szerkezete, így a kötőszövet meggyengül. Ez az oka, hogy a skorbutos betegek fogai meglazulnak, kihullanak, fogínyük vérzésre hajlamos. Mind a prolin-, mind a lizin-hidroxiláznak három-három izoenzime ismert emberben (Myllyharju, 2003; Valtavaara és mtsai, 1998).

Fontos szerep jut a protein-diszulfid izomeráznak is: a láncon belüli és a láncok közötti diszulfid-hidak képződését katalizálja, a prolin-hidroxiláz β -alegységeként részt vesz annak működésében, illetve megakadályozza a kész kollagén molekulák idő előtti összeállását (Myllyharju és mtsai, 2001, Kivirikko és mtsai, 1998, Myllyharju, 2003).

A szintézis során egy kollagén specifikus chaperonra is szükség van, ez a HSP47 (Nagai és mtsai, 2000). Az N-, és C-terminális prokollagén-peptidázok a fibrilláris kollagének végleges szerkezetének kialakításában jutnak fontos szerephez, ezekkel bővebben nem foglalkozunk.

A lizil-oxidáz a triplahelikális egységek közötti keresztkötések kialakítását végzi. Ezek a szerkezetstabilizáló összeköttetések háromfélék lehetnek: az első típusnál a lizil-oxidáz a lizin oldalláncának negyedik szénatomját oxidálja aldehiddé, miközben az aminocsoport

ammóniumion formájában távozik. Az így kialakuló lizin-aldehid egy másik fehérje lizin oldalláncával reagál, aminek eredményeképp egy Schiff-bázis, majd ennek redukált formája jön létre. A második kötési forma két lizin-aldehid aldol-kötéssé kondenzálódása. Lehetőség van három molekula kapcsolódására is: két Hyl és egy Lys létrehozhat egy gyűrűs szerkezetet, amit hidroxipiridin keresztkötésnek neveznek. A lizil-oxidáznak öt izoenzimét írták le emlősökben, kettőt *Drosophilában* (Molnar és mtsai, 2005, 2003).

A kötőszövetek újjáépülése során szükség lehet a felépített struktúrák részleges lebontására. Ez a feladat jut a mátrix-metalloproteázoknak (MMP) – például a sztromelizinnek – illetve a szerin- és cisztein-proteázoknak. Az MMP-k katalitikus működéséhez Zn^{2+} ion szükséges. Kimutatásuk zselatináz aktivitásuk miatt könnyen kivitelezhető (Myllyharju és Kivirikko, 2004; Page-McCaw, 2008).

A C-terminálisok között kialakuló, az élővilágban először a IV-es típusú kollagénben leírt kettős kovalens szulfil-imin kötések létrejötte egy különleges mechanizmus szerint történik. A peroxidazin enzim hidrogén-peroxiddal és Br^- ionnal kölcsönhatva hipobrómosav (HOBr) termelődését katalizálja. Ez reagálva a metionin kénjével, haloszulfónium ion intermediert képez, amit a (hidroxil-)lizin nukleofil aminocsoportja támad, így létrejön a kettős kötés a nitrogén és a kén között (Bhave és mtsai, 2012; McCall és mtsai, 2014; Vanacore és mtsai, 2009).

A kollagénhez köthető betegségek

A betegséget okozó mutációkat hordozó emberi gének 75%-ának van *Drosophila* megfelelője, ami egy nyomós indok a muslica mint modellszervezet alkalmazása mellett (Pandey és Nichols, 2011; Reiter, 2001). Az I-es típusú kollagén bizonyos mutációi az oszteogenezis imperfekta (Aszódi és mtsai, 1998), a X-es típusú kollagén esetén Schmidt-féle metafizeális kondrodiszplázia kialakulását indukálják (Boutaud és mtsai, 2000). Ezen kórképekben a triplahélix, és emiatt a mátrix összeállása gátolt.

Az Alport-szindróma

Az Alport-szindróma klasszikus tünetei a proteinuria és a hematuria, ami veseelégtelenségre utal. Kialakulhat sükettség a cochlea, és vakság a retina és a szemlencse diszfunkcionalitása miatt. A szemlencsét egy alapmembrán veszi körül, amit az epitelsejtek szintetizálnak. Patológias körülmények között ez lokálisan elválhat a lencsétől és előboltosul,

ezt lentikónusznak nevezzük. Attól függően, hogy ez a szemlencse elülső vagy hátulsó felszínén történik, a neve lentikónusz anterior illetve lentikónusz poszterior. A klinikai gyakorlatban retinoszkópiás vizsgálattal mutatható ki, megjelölésére a „positive oil droplet sign” kifejezést használják, mivel korai stádiumban megjelenése apró olajcseppekre emlékeztet. Amennyiben az elváltozás a lencse teljes felszínét érinti, lentiglóbuszról beszélünk (Jacobs és Meire, 2000). Kezelése új szemlencse beültetésével lehetséges (Mavrikakis és mtsai, 2002).

Az Alport-szindróma az esetek döntő többségében az X-kromoszómához kötötten öröklődik (OMIM #301050), így értelemszerűen gyakoribb a férfiak körében. Nőknél a betegség enyhébb formája jelentkezik, sejtszinten mozaikosság tapasztalható az egyik X-kromoszóma inaktivációja miatt. Ezért a típusért a *COL4A5* gén – ami a q22.3 régióban található – mutációi felelősek. A *COL4A5* és a szomszédos gének deléciója több tünetegyüttest is okozhat: amennyiben a deléció a *COL4A5*-höz képest telomerikus *FACIL4* gént érinti ATS-MR (Alport-szindróma mentális retardációval, OMIM #300194) alakul ki (Meloni és mtsai, 2002). Megjegyzendő, hogy a tünetek között szerepel mind a méhen belüli, mind a születés utáni fejlődés elmaradása, a születéskor elszenvedett agyvérzés vagy a vérképzési problémák megléte. Ha a centromerikus irányba terjed ki a deléció, leiomiomatózisról (OMIM #308940) beszélünk, ami a nyelőcső, a tüdő hörgői és/vagy a méh miometriumának jóindulatú simaizom burjánzása (Kido és mtsai, 2003). Utóbbi gyakran szürkehályoggal és süketiséggel párosul (Anker és mtsai, 2003; Cochat és mtsai, 1988). A feltárt esetek mintegy 15%-ában autoszomális recesszív öröklésmenetet sikerült bizonyítani (OMIM #203780); itt a *COL4A3* és a *COL4A4* gén (2q36.3) hibás alléljai okozták a beteg fenotípust. Egészen ritkán találkozhatunk autoszómás domináns örökléssel is (OMIM #104200). A *COL4A5* és *COL4A6* gén különleges, közös promóterrégióval rendelkezik, amely szövetspecifikusan lehetővé teszi a két gén együttes vagy külön-külön zajló transzkripcióját (Segal és mtsai, 2001).

A betegség kialakulásának hátterében gyakran az áll, hogy a hibás fehérjeláncok nem tudnak összekapcsolódni, ami a belőlük létrejövő összetett struktúra felépülésének is szükséges feltétele. Az egyedi monomerek nagyobb valószínűséggel bomlanak le proteolitikusan, akár hibásak, akár normális az As szekvenciájuk. Ez azt eredményezi, hogy nem épül fel az érett, felnőtt egyedekre jellemző filtrációs barrier és Bowman-tok, a megmaradó $(A1)_2(A2)$ - $(A1)_2(A2)$ hálózat pedig nem képes ellátni ezek feladatát. Az egyedfejlődés során a vese alapmembránja egyre nagyobb stressznek van kitéve, ezért van szükség egy ellenállóbb, stabilabb hálózatra. Ha ez nem alakul ki, akkor a meglévő gyenge

szövetek szerkezete lassan felbomlik, a membrán megvastagodik, majd elválk az általa összekötött két sejtréteg. A betegség lefolyása lassítható vérnyomáscsökkentő szerek alkalmazásával, a betegség előrehaladtával azonban szükségessé válik a szervátültetés (Hudson és mtsai, 2003; Kashtan, 2000).

A megjelenő fenotípus nem egységes, heterogenitását több tényező okozza. Egyértelműen meghatározza a mutáció helye a génen, ettől függően eltérő súlyosságú kórképek alakulnak ki. Ha a terminális doménekben történik változás, akkor a már említett felismerőhely hibája miatt nehezített a protomer összeszerelődése. Ezt az NC1 domén 12 konzervált ciszteinje közül valamelyik cseréje okozhatja. Ha a kollagén régiót érinti a mutáció, akkor azon a helyen a triplahélix szálai eltávolodhatnak egymástól, a lokális olvadáspont jelentősen lecsökken (Rost és mtsai, 2014). Ennek mértéke függ attól, hogy az új As melyik eredeti helyére épül be. A leggyakoribb a Gly cseréje más, nagyobb helyigényű monomerre.

A Goodpasture-szindróma

A Goodpasture-szindróma (OMIM 233450) egy autoimmun betegség. A tüdőben bevérzések jelentkeznek, a vese gyulladt. A szervezet antitesteket termel elsősorban a vese és a tüdő IV-es típusú kollagénjének A3 lánc, azon belül is az NC1 domén ellen. Ezen alegység vizsgálata két epitóp létezését mutatta ki, amelyek a C-terminális domének egymással érintkező felületén találhatók. Ez a tény magyarázza, hogy immunreakció csak akkor tapasztalható, ha a protomert alkotó fehérjeszálak szétválnak, amiért környezeti faktorok okolhatók: a dohányfüst és bizonyos szénhidrogének hatása bizonyított. Az anti-GBM antitestek megjelenése nem feltétlenül vezet nefritisz kialakulásához. Ha ez mégis bekövetkezik, akkor idővel az elhalt vese szövet helyét fokozatosan kötőszövet tölti ki. A betegség kezdeti stádiumában plazmaferézissel és immunszuppresszióval, gyógyszeresen legtöbbször prednizonnal kezelhető. Előrehaladott állapotú betegekben is ezt az eljárást kell alkalmazni, mert a vese állapotának további romlását ugyan nem akadályozza meg, a tüdővérzés azonban eredményesen kúrálható vele. A kiválasztó működés fenntartása érdekében dialízis, majd veseátültetés szükséges. Az Alport-szindróma és a Goodpasture-szindróma kizárják egymást, mert az előbbi esetén a proteolízis vagy a deléció miatt nem, vagy alig detektálható többek között az COL4A3 fehérje, ami az utóbbi betegség esetén az antitestek célpontja (Hudson és mtsai, 2003).

HANAC-szindróma

Sokáig nem sikerült a *COL4A1* mutációja miatt megjelenő fenotípust azonosítani, de végül 2007-re ez is megtörtént: a gén két, egymáshoz nagyon közeli, a 24. és a 25. exonban található SNP-i okozzák a HANAC-tünetegyüttest (OMIM #611773). Ez a rövidítés magában foglalja egyrészt az erek falának meggyengülésével összefüggő betegségeket, például a jellegzetes, „tekervényes” retinális artériákat, agyi aneurizmákat, másrészt a vese szöveteinek abnormális fejlődésére visszavezethető vérvezést, a ciszták megjelenését és az izomgörcsöket (Alamowitch és mtsai, 2009; Plaisier és mtsai, 2010, 2007).

Walker-Warburg-szindróma (Muscle-eye-brain disease)

A Walker-Warburg-szindróma (OMIM #236670) egy szemfejlődési rendellenességekkel, izomdisztrófiával és idegsejt migrációs problémákkal jelentkező recesszív genetikai betegség. Általában a disztroglikán poszttranszlációs módosításainak hibái okozzák, azonban nemrég leírták, hogy a *Col4a1* gén bizonyos változatai is előidézhetik ezeket a tüneteket egérben (Labelle-Dumais és mtsai, 2011).

Porenkefália

Az egér *Col4a1* gén egy splice-akceptorhelyének mutációja az agyi erek alapmembránjának patológiás megjelenését vonja maga után. Az érfal vérnyomással szembeni ellenállása meggyengül, ami a születés körüli időszakban elszenvedett agyvérzésre és porenkefáliára (OMIM #175780) hajlamossá teszi. Ezen tünetek kialakulásában környezeti faktorok is fontos szerepet játszanak. A közelmúltban derült fény az emberi *COL4A2* gén mutáns alléljeinek hasonló fenotípusos megjelenésére (Gould és mtsai, 2005; Yoneda és mtsai, 2012).

X-hez kötött hallásvesztés

A hallásvesztést a mai napig több mint negyven génnel hozták kapcsolatba. A közelmúltban írtak le egy magyar család férfitagjainál csecsemőkorban megjelenő súlyos, kétoldali hallásvesztéssel járó betegséget (OMIM #300914), ahol a fejlődés során a cochlea részben elválik a csiga belső felületétől. A nők életük harmadik vagy negyedik évtizedére

enyhe vagy közepesen súlyos halláskárosodásban szenvednek. A betegség X-kromoszómához kötött; az exonszekvenálás során a *COL4A6* gén által kódolt fehérjét érintő p.Gly591Ser aminosavcseréről bebizonyosodott, hogy a leírt tünetek kiváltója. Nemrég kimutatták a *col4a6* gén expresszióját a zebrahal embrió hallóhólyagjában is, ami tovább erősíti a homológ humán gén hallásban betöltött szerepéről kialakított elméletet (Rost és mtsai, 2014).

ASD (Anterior segment dysgenesis)

Munkám során lehetőségem nyílt Dr. Gould laboratóriumában megismerkedni a *Col4a1* mutációk okozta elváltozások patogenezisével azok egérmodelljének segítségével. Az ASD (anterior segment dysgenesis) egy több tünetet magában foglaló megnevezés, aminek megnyilvánulásai a szemfejlődési rendellenességek okozta zöldhályog és látásvesztés (Kuo és mtsai, 2012). Az alapmembrán COL4A1 fehérjét érintő emberi és egér mutációk ASD-hez vezethetnek, hasonlóan a COL4A2-höz (Bai és mtsai, 2009). A patogenezis kiindulópontjának felderítése komoly akadályokba ütközik, mivel a COL4A1 fehérje a szem alapmembránjaiban mindenhol előfordul, továbbá az ASD kialakulásában az elülső szegmens több szövete is szerepet játszik. Az elsődleges inzultus helyének felderítése érdekében a mutáns COL4A1-et helyspecifikusan fejeztették ki a szem különböző struktúráiban. Ehhez az elülső szegmens minden alkotóját érintő, súlyos ASD-t előidéző *Col4a1^{Δex41}* allélt kondicionális formában állították elő a 41. exon határaitra beépített *LoxP* helyekkel (*Col4a1^{flx41}*). Ezután a CRE rekombinázt szövetspecifikusan fejeztették ki (szemlencse, dúlcécsejt eredetű periokuláris kötőszövet, érendotél, pericita), pozitív kontrollként pedig egy általánosan expresszáló törzzsel keresztezték a kondicionális heterozigótákat. Réslámpa vizsgálatokkal és hisztológiai metszetekkel jellemezték az utódgenerációt, ez utóbbi elkészítésében vettem részt. Az eredmények egy hamarosan megjelenő publikációban lesznek elérhetők.

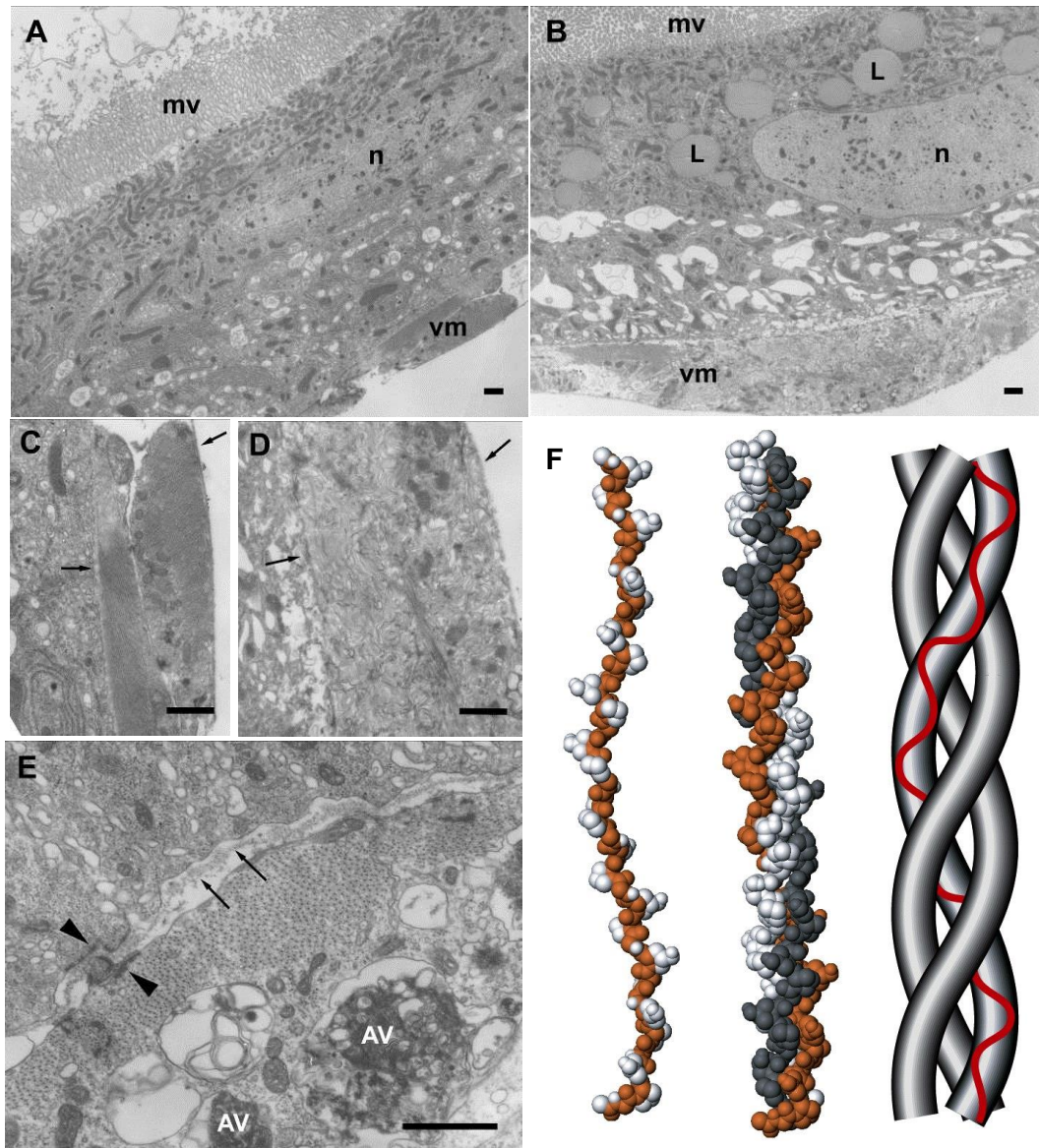
Az emésztőszervrendszer kapcsolata a bélbaktériumokkal

Az emésztőszervrendszer epitélrétege folyamatos kapcsolatban áll a lumenben található mikrobiommal, amely nexust jellemezheti kommenzalizmus, szimbiózis vagy patogenicitás (Hooper és Gordon, 2001). A *Drosophila melanogaster* is a gazda–mikroba kölcsönhatások tanulmányozására használt egyik kísérletes állatmodell (Tzou és mtsai, 2000). Az *ecetmuslica* kizárólag veleszületett immunitással rendelkezik, ami több védekezési

mechanizmust is magában foglal, például a fagocitózist, a reaktív oxigéngyökök (ROS) és az antimikrobiális peptidek (AMP) termelését (Ha és mtsai, 2005; Lemaitre és Hoffmann, 2007). Az ecetmuslica bélflóra-összetétele nagyon egyszerű, 1-20 filotípus jelenléte mutatható ki (Broderick és Lemaitre, 2012; Broderick és mtsai, 2014; Jones és mtsai, 2013). Egy közelmúltban megjelent tanulmányban a vad típusú állatok kommenzalistái mellett egy patogént is leírtak: a korábban ismert *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter pomorum* és az új faj, a *Commensalibacter intestine*-n kívül megjelent a *Gluconobacter morbifer* is (Roh és mtsai, 2008; Ryu és mtsai, 2008). A kísérletek során használt hipomorf *caudal* (*cad*) RNAi mutánsban megemelkedett az AMP-k transzkripciójának szintje, mivel a CAD az AMP-ket kódoló gének átírását szupresszálta. A megemelkedett AMP szint a kommenzalista baktériumpopuláció átstrukturálódását okozta, ami így a *Gluconobacter morbifer* dominánssá válásával a bél epitelsejtek, majd a gazdaszervezet pusztulásához vezettek 18 nappal a *cad* mRNS gátlás kezdete után (Ryu és mtsai, 2008). Ezen megfigyelésekből arra következtettek, hogy a sejtpusztulás – ami alapvető szerepet játszik a patogenezisben és a legyek elhullásában – az AMP túlexpresszió következménye.

A bél barrier funkciója lehetővé teszi a tápanyagok felszívódását, de megakadályozza, hogy a gazdaszervezet potenciálisan veszélyes anyagokkal vagy mikroorganizmusokkal kerüljön közvetlenül érintkezésbe. A gátrendszer elégtelen működése általában idős egyedekben figyelhető meg és az AMP-k fokozott expressziójával jár együtt (Rera és mtsai, 2012, 2011). Ecetmuslica *big bang* (*bbg*) gén null mutánsainál mutatható ki a barrier funkció csökkenése. A BBG fehérje a bélepitelsejtek rekeszes kapcsolódásaiban található meg, funkciója utóbbiak integritásának fenntartása. Hiányában a rekeszes kapcsolódások fellazulnak, ezért a mutánsra jellemző az élettartam csökkenése és az elülső középbél epitélrétegének krónikus gyulladása (Bonnay és mtsai, 2013).

A laboratóriumunkban fenntartott *Drosophila melanogaster* törzsek – melyek domináns, hőmérséklet érzékeny (DTS), kondicionális mutánsok – egy allélsort alkotnak, lévén, hogy mindegyikük a *col4a1* IV-es típusú kollagén gén egy hibás változatát hordozza. Korábbi vizsgálataink demonstrálták, hogy ezen egyedek harántcsíkolt izomzata súlyos miopátiát mutat, ami nagymértékű sejtpusztulással jár (Kelemen-Valkony és mtsai, 2012); hasonló degeneratív folyamatok figyelhetők meg a bél epitél- és körkörös simaizom rétegében is (1.A-E ábra; Kelemen-Valkony és mtsai, 2011). A mutánsok élet- és szaporodóképesek permisszív hőmérsékleten (20°C), de pár héten belül elpusztulnak restriktív körülmények között (29°C).



1. ábra: A középbél epitél- és izomsejtjeinek kapcsolódása az ECM-hez permisszív és restriktív hőmérsékleten L3-as stádiumú *DTS-L3* lárvában; A, C: 20°C; B, D, E: 29°C; mv: mikrovillusok, n: nucleus, vm: vizszerális izom, L: lipidcseppek, AV: autofágiás vakuólumok, nyíl: bazális lamina, nyílhegy: hemidezmoszóma; lépték: 1 μ m (Kelemen-Valkony és mtsai, 2011); F: a kollagén molekula és a belőle felépülő hármas hélix térszerkezete (Lodish és mtsai, 2010)

Célkitűzések

Korábbi vizsgálataink bebizonyították, hogy a kifejlett, *DTS-L3* allélt hordozó *col4a1* mutánsban megemelt hőmérsékleten jelentős sejtpusztulás tapasztalható a középbélben. Kíváncsiak voltunk, hogy lárvákban is kimutatható-e ez a jelenség, találunk-e TUNEL festéssel jelölhető kettős szálú töréseket a bélepitél sejtmagjainak DNS-ében.

Céljaink között szerepelt a *Drosophila melanogaster* EMS mutagenézissel előállított *col4a1* alléljaiban található mutációs helyek azonosítása. Ezek birtokában annak bizonyítása, hogy a *DTS-L3* mutáns bélrendszerében megtalálható alapmembrán tulajdonságai és a sejt-mátrix kapcsolatok az aminosavcserét szenvedett COL4A1 fehérje beépülését követően megváltoznak-e? Vizsgálni kívántuk, hogy az állatokban krónikus gyulladás lép-e fel, amit okozhat a sejt-mátrix kapcsolatok meggyengülése vagy a rezidens mikrobák jelenléte. Kíváncsiak voltunk továbbá az immunrendszer aktiválódására utaló jelenségekre, különös tekintettel az antimikrobiális peptidek és a reaktív oxigéngyökök termelődésére.

Ezzel összefüggésben kívántuk vizsgálni, hogy milyen hatással van a túlélésre az antibiotikumok használata és a rezidens bélflóra tenyésztésének alkalmazása a vizsgált törzsekben különböző hőmérsékleteken. Továbbá arra is szerettünk volna választ kapni, hogy a megváltozott alapmembrán milyen mértékben képes ellátni barrier funkcióját.

Anyagok és módszerek

Drosophila törzsek

A vad típusú *OregonR* (*OreR*) és a *col4a1* mutánsok egyaránt a széles körben használt élesztőt, kukoricalisztet és szacharózt tartalmazó, propionsavval és hidroximetilbenzoáttal kiegészített normál táptalajon nevelkedtek 20°C vagy 29°C-on.

A laboratóriumunkban fenntartott törzsek a *col4a1* gén domináns, hőmérséklet-érzékeny (dominant temperature sensitive, DTS) alléljeit hordozzák, amik rendre a következők: *a-30*, *b-9*, *b-17*, *DTS-L2*, *DTS-L3*, *DTS-L4*, *DTS-L5*, *DTS-L10*, melyek mindegyike melegérzékeny. A mutánsokat etil-metán-szulfonát (EMS) mutagenezissel állították elő (Suzuki, 1970), ami G/C → A/T tranzíciókat okoz (Pastink és mtsai, 1991). A törzsek előállításakor a hőmérséklet-érzékenység meglétét vizsgálták, ezt követte a térképezés, majd később a Cg25C lókuszt eső mutációk komplementációs analízise. A törzsek fenntartását *CyRoi* balanszer kromoszóma segíti: jellegzetes, könnyen felismerhető fenotípusa a pörge szárny és a durva felszínű ommatidium. Ennek segítségével szelektálhatók is az egyedek. A szárny pörgeése nem mindig figyelhető meg a permisszív hőmérsékleten tartott legyeken, de az összetett szem felszínének érdessége egyértelmű támpontot nyújt a szelekcióhoz.

A létrehozott *l(2)25Ca DTS/CyRoi* egyedek heterozigóták, amik magas hőmérsékletre érzékenyek, restriktív körülmények között elpusztulnak. A hőmérséklet-érzékeny egyedfejlődési stádium az embrionális fázis késői szakasza. A *DTS/DTS* homozigóták – akárcsak a balanszer kromoszóma két példányát hordozók – embrióletálisak, kizárólag *DTS/CyRoi* heterozigóták alkotják a kifejlett kísérleti populációt. Az állatok permisszív hőmérsékleten normálisan fejlődnek, noha kikelésük nagyjából egy nappal késleltetett a vad típusú legyekhez képest 25°C-on. A heterozigóták restriktív hőmérsékleten tartva egyedfejlődésük során folyamatosan hullanak el, nincs éles letális fázis. A kikelő egyedek fitnesze csökkent, beleragadnak a táptalajba és megfulladnak. A 29°C-on nevelkedett nőstényeknél sterilitás figyelhető meg, petét nem, vagy alig raknak.

TUNEL-jelölés

A TUNEL-jelölés (Terminal deoxiribonucleotide transferase-mediated dUTP-fluoresceine conjugate nick end labelling) a gyártó (In situ cell death detection kit, Roche) előírásai szerint történt. Az L3-as stádiumú lárvákat 1x PBS oldatban boncoltuk. A boncolást követően 15 percig 4% formaldehidet tartalmazó 1x PBS oldatban fixáltuk a szövetet, majd háromszor PBST-vel mostuk (0,1% Triton X-100 PBS-ben). Ezt 20 perc permeabilizálás követte 0,1% Na-citrátot tartalmazó PBST-ben, jégen, majd a folyadék nagy részét eltávolítottuk. 90 percig 37°C-on sötétben inkubáltuk az enzim és a dUTP (label solution) 1:9 arányú keverékében, majd PBST-vel háromszor mostuk. A sejtmagokat 1 µg/ml végkoncentrációjú DAPI oldattal (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboxamidin) festettük három percig, a mintákat fénytől védve. PBS-sel kétszer mostuk, majd 8 µl „mounting medium” (50 mM PBS, pH 7,4, 50% glicerín) hozzáadása után fedőlemezrel fedtük.

Mutációs helyek azonosítása

A primertervezéshez a Primerfox (<http://www.primerfox.com>) algoritmusát hívtuk segítségül. A polimeráz láncreakcióban használt primerek (II. táblázat) a következők:

Név	Szekvencia	Név	Szekvencia
F1a	CACGGATAGTGACATGAGC	R1	CATAGCTCTCTTCGATTGGC
F2a	GCCTTTAGCAAACCTCTCTTG	R2	CTCCCTTCTGTCCCATATCG
F3	TCCTCGTTTCCCGTCAAACC	R3	CCTTGATACCCATGTCTCCC
F4	TTCAAGGGCAATGCTGGTGC	R4	AAACCAATGGGTCCGGTTGG
F5	GGTCTCAATGGTCTGCAAGG	R5	TCACCAGGATAGCCAACAGC
F6	TCCCGGAATGGATGGTTTGC	R6	TCTCCCTTAGGTCCATTGCG
F7	GAAGGGTGAACCAGGAATGC	R7	CGGCAGTGTGCTATTATAGG
F8	TCTGTTGGATACTGCGTAGC	R8	GCATTGTTTCGCATTTAATCGG

II. táblázat: A szekvenálás során használt primerek

A fragmentek amplifikálásához hőstabil KAPA Taq polimerázt, Fermentas (Thermo Scientific) dNTP mixet használtunk az alábbi *touchdown pcr* protokoll szerint: kezdeti denaturáció: 94°C, 150 sec, denaturáció: 93°C, 15 sec, annealing: 65°C (-0,6°C/ciklus), 15 sec, elongáció: 72°C, 45 sec, 30 ciklus, végül 72°C, 180 sec, majd 4°C további felhasználásig. Ezt követően a mintákat 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd amennyiben a megfelelő

méretű terméket kaptuk, oszlopon tisztítottuk a fel nem használt DNS-t, majd továbbküldtük szekvenálásra. A fragmentek nukleotidsorrendjét mindkét irányból leolvastuk, az SNP-k meglétét vagy hiányát több egyedi reakcióban ellenőriztük. A szekvenciák illesztése az NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast algoritmusával történt.

A mikroRNS kötőhelyeket a MicroCosm adatbázissal azonosítottuk (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>). A fehérjeszekvenciák illesztéséhez és a konzerváltság mértékének megállapításához a ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) és a Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) algoritmusokat használtuk. A következő szekvenciákat hasonlítottuk egymáshoz:

a) NP_723046.1 (*D. melanogaster*, collagen alpha-1(IV)), NP_477190 (*D. melanogaster*, collagen alpha-2(IV));

b) COL4A1 ortológok a *Drosophila melanogaster*től a *Homo sapiens*ig: NP_723046.1 (*D. melanogaster*, collagen alpha-1(IV)), NP_001116702.1 (*Danio rerio*, collagen alpha-5(IV)), XP_420320.2 (*Gallus gallus*, similar to alpha-5 type IV collagen), XP_343779.2 (*Rattus norvegicus*, collagen alpha-5(IV)), NP_031762.2 (*Mus musculus*, collagen alpha 5(IV)), XP_001790185.1 (*Bos taurus*, collagen alpha-5(IV)), NP_001002979.1 (*Canis lupus familiaris*, collagen alpha 5(IV)), NP_000486.1 (*Homo sapiens*, collagen alpha 5(IV)), NP_001022662.1 (*Caenorhabditis elegans*, collagen alpha-1(IV)), XP_004916922.1 (*Xenopus tropicalis*, collagen alpha-5(IV)), XP_015687838.1 (*Protobothrops mucrosquamatus*, collagen alpha-5(IV));

c) *Drosophilidae* COL4A1 ortológok: NP_723044.1 (*D. melanogaster*), XP_002037904.1 (*D. sechellia*), XP_001968755.1 (*D. erecta*), XP_002088685.1 (*D. yakuba*), XP_001355957.1 (*D. pseudoobscura*), XP_001962982.1 (*D. ananassae*), XP_002021501.1 (*D. persimilis*), XP_002051848.1 (*D. virilis*).

RNS kivonás és jelölés, microarray kísérlet, adatelemzés, qPCR

Az egynapos, vad típusú és a velük egykorú *DTS-L3/CyRoi* mutánsokat az RNS-kivonást megelőzően 3 napig 18 illetve 29°C-on inkubáltuk. Szén-dioxidos altatást követően 24 legyet (12 hím, 12 nőstény) használtunk egy-egy minta elkészítéséhez, amiket 500 µl TRIZOL® reagensben (Invitrogen) homogenizáltunk és izoláltuk a gyártói előírásoknak megfelelően. A DNS szennyeződés eltávolítására a minták 5 mikrogrammnyi mennyiségeit 1

egység DNázzal (Ambion RNase-free DNase) 30 percig 37°C-on kezeltük, amely reakciót az inaktivációs reagens hozzáadásával állítottuk le (2 perc, szobahőmérséklet). A microarray kísérletekben megkövetelt kiindulási RNS minőség elérése érdekében RNeasy (Qiagen) oszlopokon tisztítottuk a mintákat, így sikerült megvalósítani, hogy a Nanodrop spektrofotométerrel mért extinkciók aránya (260nm/280nm és 260nm/230nm) minden esetben 2 feletti értéket ért el. Az említett microarray kísérlethez az Agilent 4x44k *Drosophila* platformját (Agilent ID: 018972) használtuk. 5 µg totál RNS-ből indultunk ki, amit az Agilent Two-color Quick Amp Kit segítségével jelöltünk. A négy minta kétféle jelölésével (dye-swap) technikai duplikátumot hoztunk létre, ami így nyolc mintát (III. táblázat) eredményezett:

Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
<i>Ore</i> 18°C / Cy5	<i>Ore</i> 29°C / Cy5	<i>Ore</i> 18°C / Cy3	<i>Ore</i> 29°C / Cy3
<i>DTS-L3</i> 18°C / Cy3	<i>DTS-L3</i> 29°C / Cy3	<i>DTS-L3</i> 18°C / Cy5	<i>DTS-L3</i> 29°C / Cy5

III. táblázat: A minták elhelyezkedése az array-en

A jelöléssel ellátott mintákat 65°C-on, 10-es percenkénti fordulatszámon, 17 óráig hibridizáltattuk az array-re 2x GEx HI-RPM hibridizációs pufferben. A tárgylemezeket GE Wash Buffer 1-gyel majd GE Wash Buffer 2-vel mostuk és Agilent G2505B scannerrel olvastuk le. A képfájl feldolgozásakor a Feature Extraction Software 8.5 (Agilent Technologies) volt segítségünkre. A nyers feldolgozott jelerősségeket (raw processed signal intensities) totál intenzitásra normalizáltuk a subarray-ek közötti összehasonlíthatóság érdekében. Az így kapott adathalmazt a következő négy jellemző együttes megléte alapján szűrtük: "*green is positive and significant*", "*red is positive and significant*", "*green is well above background*" és "*red is well above background*", mivel egy háttértől szignifikánsan eltérő foltot nincs értelme összehasonlítani egy olyannal, ami ennek a követelménynek nem felel meg, ugyanis növelnénk a fals pozitív találatok számát. Ezen jellemzők a szoftver beépített minőségellenőrző rendszerének részét képezik; meghatározásuk során egyrészt a folt átlagos intenzitásértékének a háttértől való eltérése mértékét (kétoldalas t-teszt), másrészt a háttér- és a jelintenzitás egy előre meghatározott arányát vizsgálja mindkét szín esetében. A program szignifikáns eltérés esetén 1-et, ennek hiánya esetén 0 értéket rendel az adott foltához.

A normalizált értékek szűkített listáját kettes alapú logaritmussá transzformáltuk, két mintás t-próbának vetettük alá (egyenlő varianciákat feltételezve), kiszűrtük a $p < 0,01$ értékeket és átlagoltuk az azonos oligókhoz tartozó párhuzamos mérésekből származó értékeket. Az adatfeldolgozás során GeneSpring GX és Microsoft Excel programokat használtuk.

A vad típusú és a mutáns *DTS-L3/CyRoi* genotípusú egyedek hőmérséklet hatása megváltozó működésű génjeit, illetve azok szervspecifikus kifejeződését kifejezett, vad típusú állatban összefoglaló VII. táblázat a VI. táblázat génlistája alapján készült a FlyAtlas adatbázisának (<http://flyatlas.org/>) felhasználásával. Ennek az egyes oligókhoz rendelt expressziós értékeiket három kategóriába soroltuk: 100-nál kisebb érték alatt alacsony, 100 és 500 között közepes (+), 500 feletti értékek magas vagy nagyon magas (++) jelzést kaptak. Ezek alapján könnyedén megállapíthatók a génkifejeződési mintázat megváltozása által érintett szervek.

A függelék VI. táblázatában szereplő génlista génontológiai elemzése a Panther adatbázisával (<http://pantherdb.org/>) készült. Az alkalmazott módszer a „Panther Overrepresentation Test” volt (Release 20160715), a „GO Ontology” adatbázis (2016. 08. 22-i verzió) „Drosophila melanogaster” referencia génlistáját felhasználva. Az elemzést a függelék VIII. és IX. táblázata összegzi.

A microarray eredményeinek validálása QRT-PCR-rel történt az eredeti RNS extraktumok felhasználásával három párhuzamos mérés átlagolásával. A cDNS szintézishez Fermentas RevertAid reverz transzkriptázt használtunk Invitrogen random primerekkel, az RNS lebomlását pedig RNaseOut hozzáadásával (Invitrogen) gátoltuk meg. A qPCR reakciót Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR rendszeren hajtottuk végre KAPA Sybr Fast Universal qPCR master mix alkalmazásával az előírt protokollnak megfelelően. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 5 μ l 2x Master Mix (ROX-végkoncentráció: 10 nM), 1 μ l primer (50-800 nM), 1 μ l cDNS (100 ng), 3 μ l ddH₂O. A reakció végbemeneteléhez optimalizált program lépései ekként alakultak: UDG-előkezelés: 50°C, 120 sec, kezdeti denaturáció: 95°C, 30 sec, denaturáció: 95°C, 3 sec, annealing és elongáció: 60°C, 40 sec, az utolsó két lépés 40 cikluson át ismételve. Az alkalmazott primerkoncentrációk beállítása során olvadáspont elemzéssel és agaróz gél elektroforézissel bizonyosodtunk meg róla, hogy másodlagos termék nem képződik. Minden méréshez kalibrációs egyenest készítettünk, a génkifejeződési szinteket a vad típusú állatok 18°C-os

értékeihez viszonyítottuk. A C_t hatványkitevőt a számolt reakcióhatékonysággal és a cDNS mennyiségével korrigáltuk. Az eredmények megbízhatóságát Student-féle t-tesztel igazoltuk.

A bélben történő AMP fehérjeszintű termelődésének bizonyításához első lépésben kereszteztük az *Att-GFP* transzgént homozigóta formában, harmadik kromoszómán hordozó törzset (Tzou és mtsai, 2000) az *OreR* és a *DTS-L3/CyRoi* törzsekhez. A legfeljebb 3 napos kifejlett egyedeket a *CyRoi* balanszerkromoszóma veszteségre történő szelekciója után három napig 20°C illetve 29°C fokon tartottuk. A beleket PBS-ben történő boncolást követően fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus BX51) vizsgáltuk.

Reaktív oxigéngyökök (ROS) mennyiségének meghatározása

Kondícióként ötven, legfeljebb három napos kifejlett egyed (25 nőstény, 25 hím) 450 µl jéghideg PBS-ben homogenizáltunk, majd centrifugáltuk (17,000g, 15 perc, 4°C) és a tiszta felülúszót használtuk a H_2O_2 , $ONOO^-$ és a fehérje mennyiségi meghatározáshoz, mintánként legalább három párhuzamos mérést végezve. A fehérjét Folin-Ciocalteu reagenssel határoztuk meg, BSA (bovine serum albumin) sztenderdet alkalmazva (Lowry és mtsai, 1951). A spektrofotometriás méréseket Genesys 10S UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Scientific) hajtottuk végre: a H_2O_2 meghatározása esetén 0,05 mg/ml-es torna-peroxidáz és 0,1 mg/ml-es o-dianizidin foszfát pufferes (100 mM, pH 6,5) oldatot használtunk. A H_2O_2 spektrofotometriás mérése 400 nm-en zajlott (Villegas és mtsai, 1998). A peroxi-nitrit meghatározás előkészítésekor a mintákat 1M NaOH-dal (60:1) elegyítettük, majd 302 nanométernél abszorbanciát mértünk. A kontrollként szolgáló mintákhoz 100 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,4, 60:1) adtunk. Az abszorbanciának a peroxi-nitrit bomlásával együtt járó csökkenését semleges pH-n mértük. (Huie, 1993)

Baktériumok izolálása, 16S rRNS amplifikáció

Törzsenként és kondícióként (legfeljebb 24 órás felnőtt állatok, három nap inkubáció 20°C vagy 29°C-on, mikrohullámmal előző nap kezelt, legfeljebb három napos fiolákban) öt-öt szén-dioxiddal altatott, majd dekapitált hím egyed emésztőtraktusát boncoltuk ki – teljes hosszában, de a gyomor nélkül – majd 70%-os etanolban fertőtlenítettük a külső felszínét (Ryu és mtsai, 2008). 100 µl steril SB oldatban (Super Broth: 3,2% pepton, 2% élesztőkivonat, 0,5% NaCl) homogenizáltuk, majd 500-szoros hígítás után 80 µl-t szélesztettünk mannitolos agar (0,3% pepton, 0,5% élesztőkivonat, 2,5% mannitol, 2% agar),

SB agar (Super Broth: 3,2% pepton, 2% élesztőkivonat, 0,5% NaCl, 2% agar) vagy MRS agarra (Scharlau: 10 g/l pepton, 8 g/l húskivonat, 4 g/l élesztőkivonat, 20 g/l D(+)-glükóz, 5 g/l nátrium-acetát, 2 g/l triammónium-citrát, 0,2 g/l magnézium-szulfát, 0,05 g/l mangán-szulfát, 2 g/l dikálium-foszfát, 1 g/l Poliszorbát 80, 14 g/l agar) és 25°C-on inkubáltuk. Az MRS agar a *Lactobacillusok* tenyésztésére szolgál, ennek ellenére megjelenik rajta az *Acetobacter* is kisebb telepmérettel, illetve ennek fordítottja figyelhető meg mannitolos agaron, ami elsősorban *Acetobacter* fajok növesztésére alkalmas. Az egyértelműen elkülöníthető telepeket felhasználva kolónia PCR-rel azonosítottuk a fajokat. A baktériumok 16S rRNS génjét a 8FE (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) és 1492R (GGMTACCTTGTTACGACTT) primerpárral (Ryu és mtsai, 2008) használatával amplifikáltuk, majd agaróz gélen történt ellenőrzés után a Macrogen-hez (Szöul, Dél-Korea) vagy az Eurofins MWG Operon-hoz (Ebersberg, Németország) küldtük szekvenálásra. A kapott szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisához (Nucleotide collection) a Blast algoritmus alkalmazásával hasonlítottuk. A szekvenciák 98%-osnál nagyobb különbsége esetén két külön haplotípusként azonosítottuk a telepeket.

Antibiotikus kezelés, baktérium etetés, a bél határoló funkciójának vizsgálata

Az antibiotikus kezeléshez 15-15, legfeljebb 24 órája kikelt nőtényt és hímet zártunk egy fiolába. Három-három párhuzamos mérést végeztünk az *OreR* és a *DTS-L3/CyRoi* mutánsal, mindkét törzs esetén permisszív és restriktív hőmérsékleten. Ampicillin és tetraciklin 50%-os etil-alkoholban oldott keverékét használtuk a baktériumok elleni küzdelem során 500 µg/ml és 50 µg/ml végkoncentrációban. A fiolákat az alkalmazás előtti napon készítettük elő és hatnaponta cseréltük, szén-dioxidos altatás mellett.

A baktériumok csíraszama hatásának vizsgálatához az előbbihez hasonlóan 15-15, legfeljebb 24 órája kikelt nőtényt és hímet használtunk. A korábban izolált *Lactobacillus* és *Acetobacter* törzsek 4 ml SB tápoldatban, 25°C-on OD₆₀₀=1 értékig növesztett tenyészetét használtuk a sterilizált táptalaj felszínének előző napi beoltásához (100 µl/fiola). A beoltáshoz 10⁸, 10⁷ és 10⁵ sejtet használtunk. A másnapi felhasználásig 4°C-on tároltuk a fiolákat, melyeket minden nap cseréltünk, szén-dioxidos altatás mellett. Legalább három párhuzamos mérést végeztünk az *OreR* és a *DTS-L3/CyRoi* törzsekkel permisszív és restriktív hőmérsékleten.

A bél barrier funkciójának monitorozásához és a SMURF fenotípus megjelenésének kimutatásához a patentkék V (*Patent Blue V*; *E131*; CAS Number: 20262-76-4) nevű ételfesték alkoholos oldatát kevertük a táptalajba harmincszoros hígításban. A fenti kísérletekhez hasonlóan 15-15, legfeljebb 24 órája kikelt nőtényt és hímet használtunk. Minden esetben legalább három párhuzamos mérést végeztünk az *OreR* és a *DTS-L3/CyRoi* törzsekkel permisszív és restriktív hőmérsékleten. A megfestett táptalajt tartalmazó fiolákat a másnapi felhasználásig 4°C-on tároltuk, azokat a legyek alatt háromnaponta cseréltünk, széndioxidos altatás mellett. A festés táplálkozás után láthatóvá teszi a béltraktust. Amennyiben kizárólag a belek festődnek, egészségesnek, ha más képlet is (például testüreg, fej) betegnek (SMURF) tekintettük az állatot.

Eredmények

A hőmérséklet érzékeny *col4a1* mutációk konzervált glicin aminosavakat érintenek

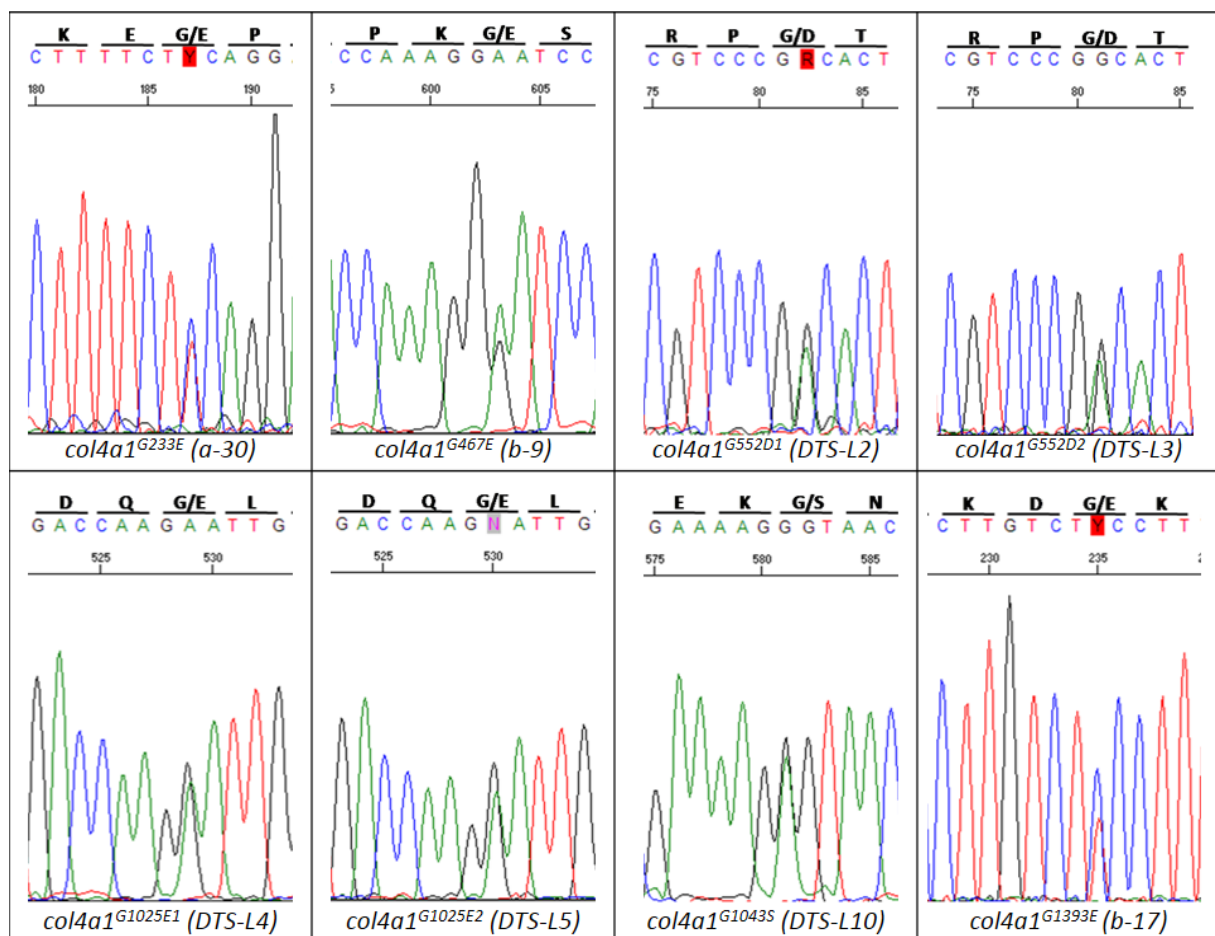
Feltételeztük, hogy a korábban megfigyelt fenotípust a sejtek ECM-hez való gyengébb kötődése okozza, amit előidézhethet a sejtek integrin fehérjéi és a mátrix közötti kapcsolatok gyengülése, esetleg a kapcsolódások számának csökkenése. A G/C→A/T tranzíciót okozó EMS kezelés hőmérséklet érzékeny, misszenz léziókat okozott, amik esetünkben egy kicsi, apoláros As nagyobb térkitöltésű, poláros vagy töltött As-ra cserélődéséhez vezettek. A mutációt hordozó *col4a1* allélek szekvenálásával a legtöbb esetben a kollagén doménben található – evolúciósan erősen konzervált – glicin aminosavak cseréjét mutattuk ki (2, 15, 16, 17. ábra).

A p.G233E (a fehérje 233. aminosava glicin helyett glutaminsavra cserélődik), a p.G1025E és a p.G1043S szubsztitúciók integrin-kötőhelyet (konszenzus szekvencia: GXPGEK; Parkin és mtsai, 2011) vagy annak közvetlen környezetét érintik (IV. táblázat). A p.G552D aminosavcsere hatása közvetett: a GLPGEK és az RGD integrin kötő motívumok a COL4A2 láncon találhatók. Ez a csere megváltoztathatja a triplahélix negyedleges szerkezetét, így téve lehetetlenné az integrin kapcsolódását. Látható, hogy két-két allél esetében a mutációk izoallélikusak (*col4a1*^{G552D1}, *col4a1*^{G552D2}, illetve *col4a1*^{G1025E1}, *col4a1*^{G1025E2}). A megfigyelés nem meglepő, mivel hasonlóan erős szelekciós nyomással végzett mutagenézis *C. elegans*-ban a *col4a1(emb-9)* izoallélikus (p.G408E) mutánsainak keletkezéséhez vezetett (Guo és mtsai, 1991). A p.G467E és a p.G1393E szubsztitúció környezetében nem sikerült ismert motívumot azonosítani.

Az eddig összegyűlt adatok alapján az emberi kollagén IV mutációk esetén feltételezzük, hogy az újonnan beépülő aminosav anyagi minősége megszabja a betegség fenotipikus megjelenését, amit a súlyos és az enyhe tüneteket mutató esetek számának

arányával jellemeznek: a G/E 4,9, a G/D 1,4, a G/S csere 0,7-es értéket ad (Parkin és mtsai, 2011). A p.G1393E mutáció közvetlen környezetében a COL4A2 szálon a kollagén doménben egy rövid szabálytalan szakasz található, ahol a szekvenciaillesztés alapján csak öt aminosav van a párhuzamos COL4A1 szálak hat aminosava helyett.

A glicint kódoló tripletteket érintő tranzíciókon kívül több pontmutációt azonosítottunk. Ezek egy része minden törzsben megtalálható volt, ezért nagy biztonsággal kijelenthető, hogy azokat a balanszer kromoszóma hordozza. A G1882A pontmutáció, ami p.K288T cseréhez vezet és a G3468A tranzíció, ami p.A1081T szubsztitúciót okoz, olyan guanin bázisokra van hatással, amik még a *Drosophilidae*-n belül sem konzerváltak (lásd: szekvencia illesztések a függelékben, 17. ábra). A G3602T transzverzió, ami p.K1125N cserét eredményez, már egy erősen konzervált aminosavat érint (függelék: 16, 17. ábra). Ennek közelében a COL4A2 szálon integrinkötő RGD szekvencia található (2. ábra, függelék: 15. ábra). A csendes mutációkról a függelék V. táblázata ad áttekintést.



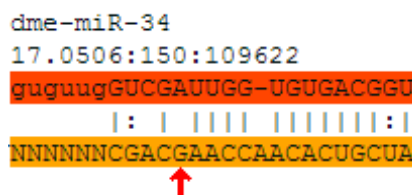
2. ábra A *col4a1* gént érintő SNP-k kromatogramjai a vizsgált törzsekben (régi és új elnevezésekkel)

Allél	As csere (COL4A1)	Fehérje	Aminosavszekvencia-részletek illesztése (Parkin, 2011 nyomán)
<i>a-30</i>	p.G233E	COL4A1 COL4A2	N-GFP <u>GEKGER</u> GDS-C N-GFDGDRGSKGDT-C
<i>b-9</i>	p.G467E	COL4A1 COL4A2	N-GPK <u>G</u> SIGPIGHPGPP-C N-GFIGPPGPQGPPGEA-C
<i>DTS-L2,</i> <i>DTS-L3</i>	p.G552D	COL4A1 COL4A2	N-GRP <u>G</u> TPGQKGD MI KGD-C N-GYNGLRGLPGEKGLR <u>GD</u> -C
<i>DTS-L4,</i> <i>DTS-L5,</i> <i>DTS-L10</i>	p.G1025E, p.G1043S	COL4A1 COL4A2	N-GDQ <u>G</u> LAGAPGQQGLD <u>GMPGEK</u> <u>G</u> NQ-C N-GDDGPDGYPGANGLPGRKGETGNP-C
<i>b-17</i>	p.G1393E	COL4A1 COL4A2	N-GFEGQK <u>G</u> DKGDR-C N-GYAIV.GRQGDI-C

IV. táblázat A vizsgált *col4a1* mutációk okozta aminosavcserek és helyzetük a fehérjén belül összeillesztve a COL4A2 lánc megfelelő szekvenciájával (az egyszerűség kedvéért a triplahélixet alkotó két COL4A1 fehérje közül csak az egyik szekvenciája került feltüntetésre). Az aláhúzás a feltételezett integrin kötőhelyeket, a piros kiemelés az aminosavszubsztitúciókat jelöli

A 3' UTR régióban a *miR-34* mikroRNS MicroCosm adatbázis által előjelzett három kötőhelyének egyikét érintette egy pontmutáció az 5036897-es pozícióban (G→A tranzíció). Ez a változás azonban feltehetően nem befolyásolja a *miR-34* kötődésének erősségét, mivel

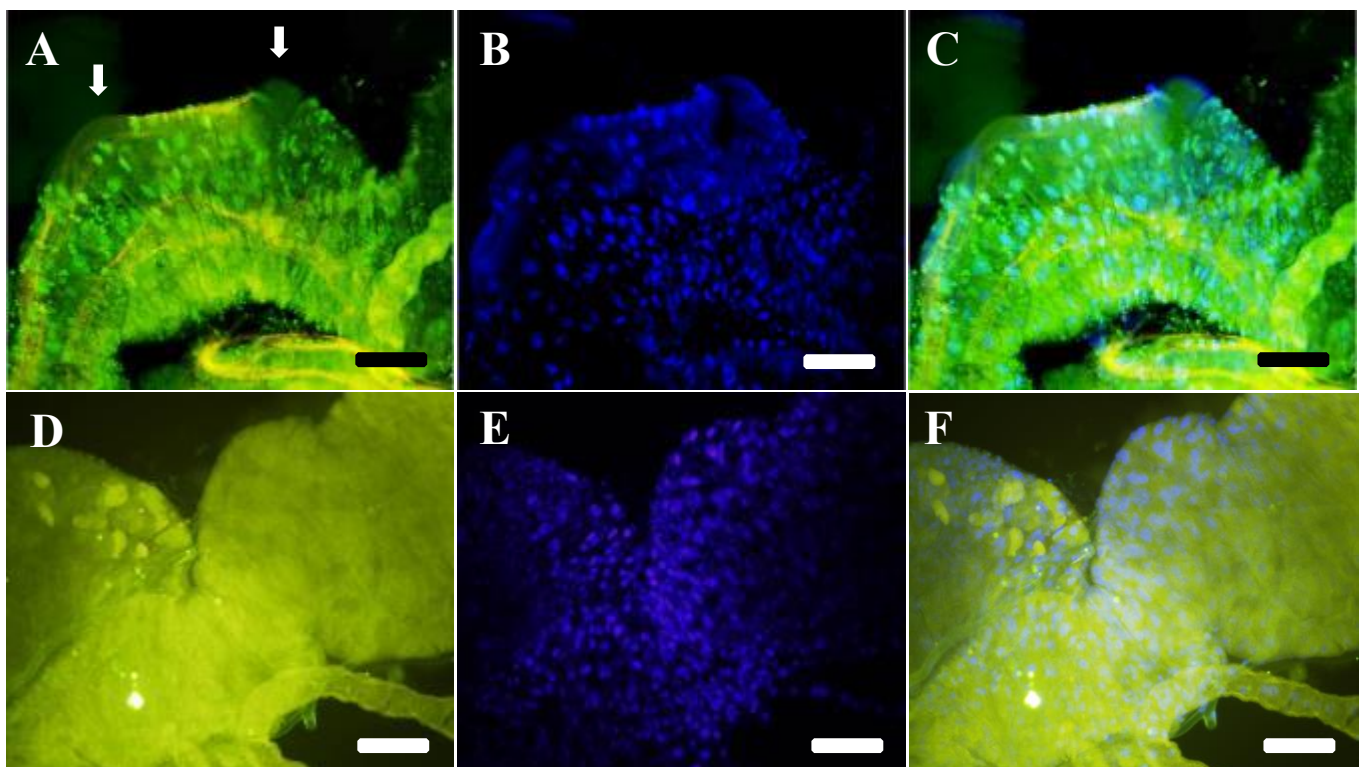
nem változtatja meg a komplementer bázispárok között kialakuló hidrogénkötések számát (3. ábra).



3. ábra A *miR-34* mikroRNS feltételezett kötőhelyét érintő G→A nukleotidcsere (piros nyíllal jelölve) a 3' UTR régióban. Felül, pirossal kiemelve a *mikroRNS*, alul, narancssárgával a mRNS nukleotidszekvenciája látható

A *col4a1* gén *DTS-L3* allélje sejtpusztulást okoz az L3-as stádiumú lárvák középbélében

A domináns hőmérséklet érzékeny *DTS-L3* allélt hordozó *col4a1* mutánsok kifejlett egyedeiben nagymértékű sejtpusztulás tapasztalható restriktív hőmérsékleten, túlélésük a legalacsonyabb a vad és többi mutáns törzshöz viszonyítva egyaránt. Ezen felül a középbél több helyen divertikulumokat képez (4.A-C ábra), míg a vad típusú lárvák belének felszínén (4.D-F ábra) ilyen jelenség nem tapasztalható. Feltettük a kérdést, hogy vajon restriktív hőmérsékleten a mutáns bélepitél- és izomsejtek DNS molekulái tartalmaznak-e kettős szálú töréseket és hogy ezek jelölhetők-e TUNEL-lel. A divertikulumok környezetében lévő epitél- és simaizom sejtek magvai TUNEL pozitívak voltak (4.A-C ábra), ezért elképzelhető, hogy bennük apoptózis játszódik le. Ez a jelenség a permisszív hőmérsékleten nem tapasztalható (4.D-F ábra), TUNEL-lel nem, kizárólag DAPI-val festődnek a sejtmagok. Maguk a divertikulumok is patológiás megjelenésűek: sejteket nem tartalmaznak, kizárólag az emlős mukózának megfelelő peritróf membrán kitüremkedései alkotják azokat. Ezen megfigyelések megerősítik korábbi megállapításainkat (sejtpusztulás a petevezetőben; Kelemen-Valkony és mtsai, 2012), mely szerint a *col4a1* mutánsok szisztémás, több szervet érintő fenotípust mutatnak.



4. ábra: TUNEL pozitív sejtmagok az L3 stádiumú lárva középbelében; A: L3 stádiumú, 29°C-on nevelt *DTS-L3* lárva középbele, TUNEL-jelölés; a nyilak a divertikulumokat és a kitüremkedő peritróf mátrixot mutatják; B: DAPI-festés; C: A és B illesztése; D, E, F: L3 stádiumú, 20°C-on nevelt *DTS-L3* lárva középbele; lépték: 50 μ m

AMP (antimikrobiális peptid) túlexpresszió a *col4a1* gén *DTS-L3* alléljét hordozó mutánsban

Hipotézisünk szerint a vizsgált *col4a1* mutánsok olyan szervei lehettek érintettek, ahol a IV-es típusú kollagén génje kifejeződik (szív, zsírtest, spermatéka, bélrendszer, ovárium). Feltételeztük, hogy az állatok bélrendszerének alapmembránja is károsodott, ami befolyásolhatja annak barrier funkcióját és a bélflóra összetételét. Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a mutánsokban lezajló folyamatokba, összehasonlító génexpressziós vizsgálatot végeztünk az Agilent *Drosophila*-specifikus microarray platformja segítségével.

A vizsgálatba vont *DTS-L3/CyRoi* mutánsban restriktív hőmérséklet hatására bizonyos gének kifejeződése jelentősen megemelkedett, míg a vad típusban ugyanezek csökkentek (Függelék VI. táblázat). Többek között így viselkedett a veleszületett immunválasz végrehajtói közül az *Attacin-A* és *C*, a *Diptericin*, *Diptericin-B* és a *Metchnikowin*, amik antimikrobiális peptideket kódolnak, szerepük a baktériumok elleni védekezésben kiemelkedő (Lemaitre és mtsai, 1997). Szintén ebben az irányban változott a zsírtestben szintetizálódó, a bakteriális sejtfal lebontásában közreműködő *N*-acetilmuramoil L-alanin amidázt kódoló *PGRP-SB1* (Mellroth és Steiner, 2006; Werner és mtsai, 2000; Zaidman-Rémy és mtsai, 2011), vagy a közép- és utóbélben termelődő *Lysozyme X*. Az antimikrobiális peptidekhez hasonlóan ezek is a baktériumok jelenlétének hatására indukálódnak (Broderick és mtsai, 2014). Megfigyelhető továbbá a peritróf membrán komponenseinek módosult kifejeződési mintázata: a *CG10154* és a *CG10725* az előbbiekhöz hasonló irányban változott a kezelés hatására. Broderick és munkatársai konvencionálisan nevelt és steril körülmények között tartott legyek összehasonlításával megállapították, hogy a *CG10154*, *CG10725* és a *vanin-like* termelődése csökkent az előbbi csoportban (Broderick és mtsai, 2014). A *vanin-like* egy pantetein hidrolázt kódol, ami a pantoténsav (B₅-vitamin) bioszintézisében játszik szerepet, ami pedig a koenzim A előállításához szükséges; egyes vizsgálatok alapján feltételezik, hogy szerepe lehet a sebgyógyulásban (Heise és mtsai, 2012; Inlow és Restifo, 2004; Wiederholt és mtsai, 2009). A *CG17234* egy szerin típusú endopeptidázt kódol, ami a spermatékában termelődik, szintézise megemelkedik párzás után, illetve rovarölő szereknek ellenálló törzsekben (Kalajdzic és mtsai, 2012; Kelleher és Pennington, 2009; McGraw és mtsai, 2008). A *CG31091* egy lipáz, ami a középbélben fejeződik ki: vad típusban normál körülmények között a steril táptalajon nevelt legyekkel összehasonlítva alulexpresszált (Broderick és mtsai, 2014). A *CG6188 (Gnmt)* egy S-adenozil-L-metionin:glicin *N*-metiltranszferáz – ami szarkozint állít elő glicinből –, átírása éheztetés hatására intenzívebbé válik. A steril gyulladás a Toll-útvonalat aktiválja, ami pedig a *Gnmt* szintjét növeli meg (Obata és mtsai, 2014). A *CG8303* egy szekvencia hasonlóság alapján azonosított peroxisomális zsírsav-koenzim A reduktáz, ami zsíralkoholokat képez (Faust és mtsai, 2012). A *CG9825* egy középbéli transzmembrán foszfát-nátrium szimporter, ami bélbaktériumok jelenléte esetén csökkent kifejeződést mutat (Broderick és mtsai, 2014). Junion és munkatársai megállapították, hogy a *ladybird (lb)* a *CG9825* kifejeződését növeli (Junion és mtsai, 2007).

Az előzőekben felsorolt génekkel szemben éppen ellentétesen változott a *CG13043* gén expressziója: a mutánsban csökkent, a vad típusban megnőtt. A *CG13043* egy feltételezett

kutikuláris fehérjét kódol, ami alaninban és valinban gazdag, Retinin C domént tartalmaz és a lárvális tracheában fejeződik ki (Cornman és Willis, 2009).

Vizsgálatunk során olyan géneket is azonosítottunk, amelyek – bár eltérő mértékben, de – mindkét törzsben felülexpresszáltak. Ezek a *His3:CG33830*, a *CG5770* és a *Hsp22* voltak. A *His3:CG33830* terméke a nukleoszómák alkotója; a *CG5770* egy ismeretlen funkciójú, aszparaginsavban gazdag, DIF által indukálható, *Drosophilidae*-specifikus protein (Broderick és mtsai, 2014; Kim és mtsai, 2004). A *Hsp22* egy leírt hősokk fehérje, ami oxidatív stressz hatására fejeződik ki a mitokondriumban, szintje a kor előrehaladtával fokozatosan emelkedik; valószínűleg chaperonként működik (King és Tower, 1999; Morrow és mtsai, 2004).

A mindkét törzsben csökkent kifejeződésű gének nagyobb részének funkciója ma még ismeretlen. A *BobA* (*Brother of Bearded A*) a Notch-útvonal egyik tagja, továbbá leírták szerepét a baktériumok elleni védekezésben is (Ayres és mtsai, 2008; Lai és mtsai, 2000). Az *Obst-B* az embrionális, majd a lárvális trachea kutikularétegének építője, a kitinkötő peritrofinok homológja. Kimutatható a fejlődő közép- és utóbélben is (Barry és mtsai, 1999; Behr és Hoch, 2005). A *CG10035* csak az embriogenezis során expresszálódik, amit a Toll útvonal befolyásol (Boutros és mtsai, 2002; Zúñiga és mtsai, 2009), míg a *CG16884*, *CG16885*, *CG4962* gének termékei a lárva tracheáiban szintetizálódnak, funkciójuk *CG16884* kivételével – mely a szárnydiszkszusz fejlődéséhez szükséges – ismeretlen (Ibrahim és mtsai, 2013). A *CG4962* gént a párzási viselkedéssel és az agresszivitással kapcsolatban említi a szakirodalom (Ellis és Carney, 2011; Zwarts és mtsai, 2011). A *CG8664* a lárvális középbélben detektálható, korábbi vizsgálatok feltételezik, hogy a DIF szabályozója lehet. A *Dup99B* egy szexpeptidet kódol, hímek termelik és a párzás során juttatják a nőstény testébe, ami azokban a kopulációs hajlandóság csökkenéséhez és a peterakás intenzifikálódásához vezet (Kubli, 2003; Rexhepaj és mtsai, 2003).

A vad típusú és a mutáns *DTS-L3/CyRoi* genotípusú egyedek hőmérséklet hatása megváltozó működésű génjeit, illetve azok szervspecifikus kifejeződését kifejezett, vad típusú állatban a függelék VII. táblázata foglalja össze. Ennek segítségével kívánjuk áttekinthetően bemutatni, hogy a hősokkot követő génátírás-változások várhatóan a fejet, a szemet, a közép- és az utóbelet, a szívet, a zsírtestet és a spermatékát érinthetik elsősorban, mivel itt jelentős a felsorolt gének expressziója a FlyAtlas adatbázisa szerint.

A microarray kísérletben megváltozott expressziót mutató gének listáját felhasználva génontológiai elemzést végeztünk a Panther adatbázis segítségével. A VIII. táblázat a biológiai folyamatok, a IX. táblázat pedig a molekuláris funkció szerinti felosztást mutatja. Az

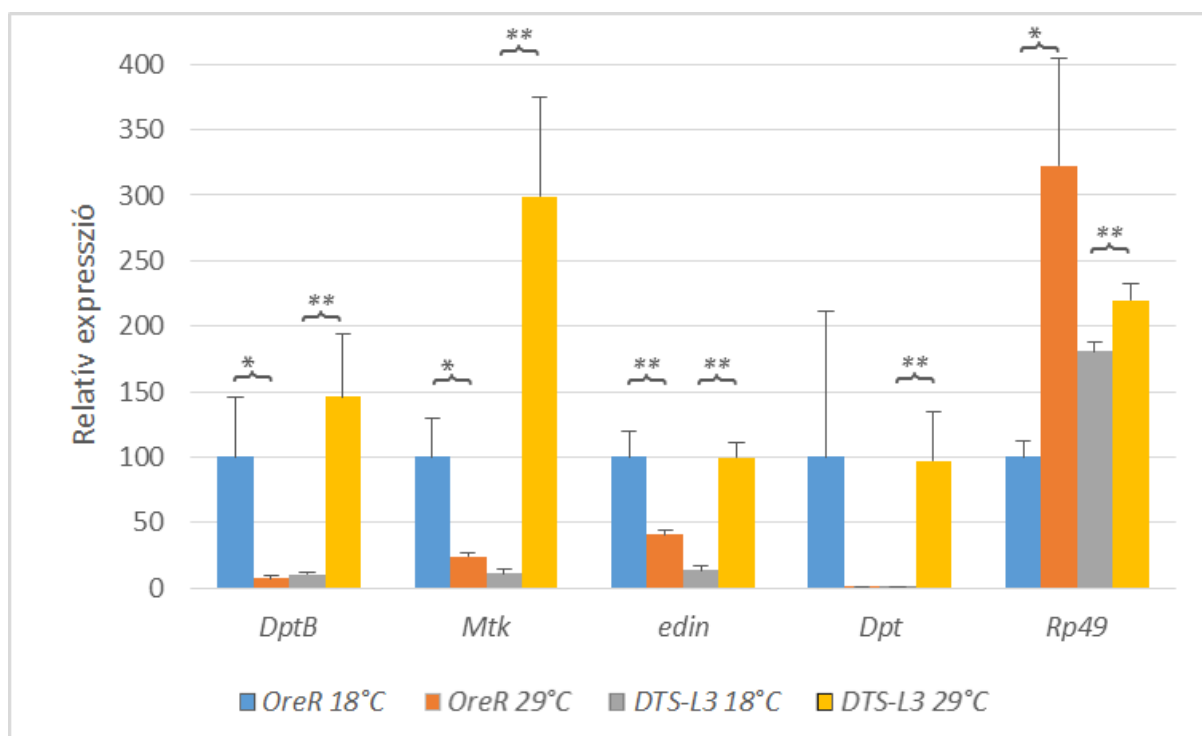
előbbi listában megtaláljuk a kórokozóra adott immunválaszhoz köthető génontológiai kategóriákat, melyek a Bonferroni-korrekció alkalmazása után is megmaradtak, így a vártnál szignifikánsan gyakoribbnak tekinthetők. A IX., molekuláris funkciókat felsoroló táblázat azonban ugyanezen korrekció elvégzése után egyetlen elemet sem tartalmazott, így új információval nem járult hozzá analízisünkhöz.

A kapott eredmények alátámasztották nullhipotézisünket: a vad típusú és a mutáns állatokban hősokk hatására ellentétesen változott az antimikrobiális peptidek génjeinek kifejeződése. A vad típusnál a hőmérséklet emelése hatására lecsökkent, míg a *DTS-L3/CyRoi* genotípusú egyedekben megnőtt ezen gének expressziója.

Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a mutáns állatok a környezeti hőmérséklet emelésére az immunrendszer aktivitásának növelésével válaszoltak.

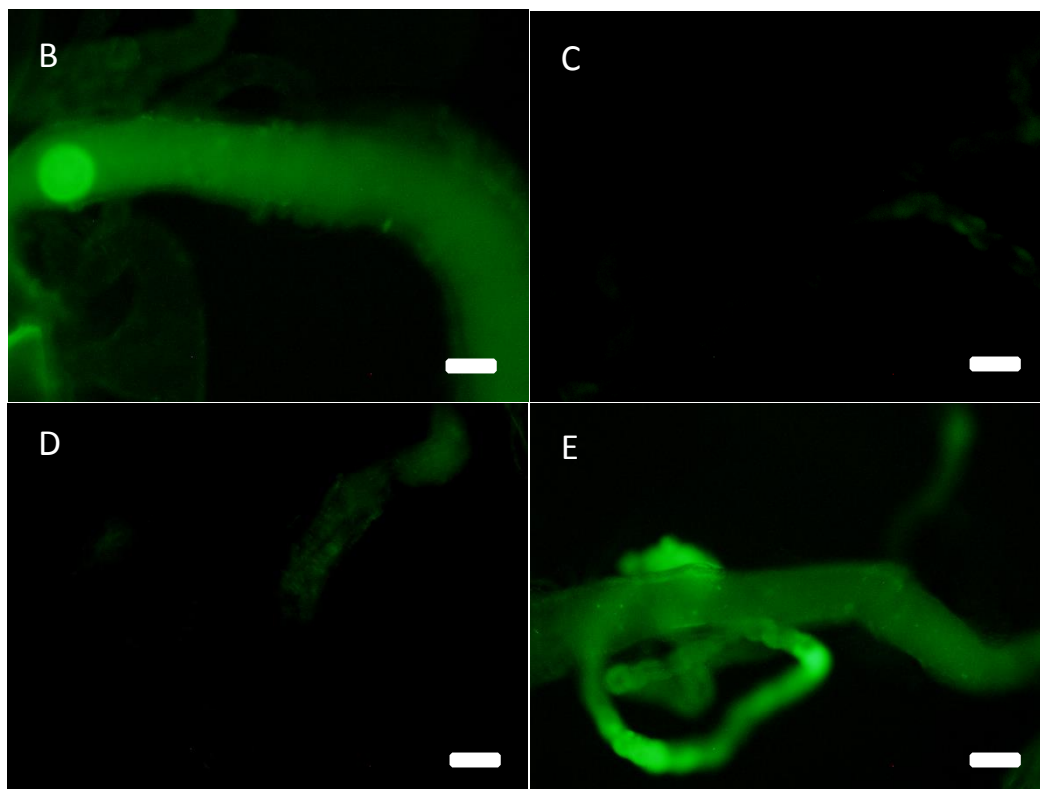
A microarray-kísérlet eredményeinek validálása qPCR-rel és egy transzgenikus AMP törzs segítségével

Technikai megfontolásokból általános elvárás a microarray kísérlet szolgáltatott eredmények megerősítése kvantitatív RT-PCR-rel (5.A ábra). Ennek során a *Dpt*, *DptB*, *Mtk*, *edin*, illetve kontrollként az *Rp49* mRNS szintjét indikáló cDNS koncentrációját mértük meg. Eredményeink alátámasztják a microarray kísérlet során látott tendenciákat: a vad típusban az *Rp49* kivételével a hőmérséklet emelésének hatására csökkent, a *DTS-L3* mutánsban megnőtt a *Dpt*, *DptB*, *Mtk* és az *edin* transzkripciója, melyek immunrendszer effektorai (AMP-k) vagy szabályozói (*edin*; Vanha-Aho és mtsai, 2016).



5.A ábra A qPCR-kísérlet eredménye egybecseng a microarray adatokkal: restriktív hőmérsékleten a kifejlett, *DTS-L3* allélt hordozó *col4a1* mutánsok bizonyos AMP génjeinek kifejeződése szignifikánsan megemelkedik. A relatív expressziós szint (százalékban kifejezve) megállapításához minden esetben az adott gén *OreR* törzsben, 18°C-on mért jelet vettük 100%-nak; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

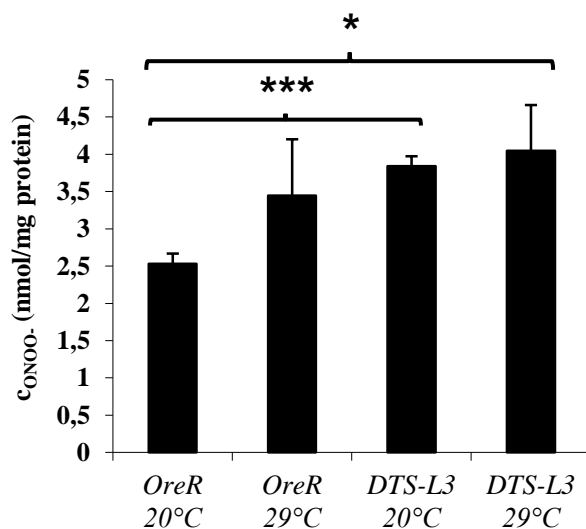
Annak érdekében, hogy fehérjeszinten is megbizonyosodhassunk az antimikrobiális peptidek emésztőszervi kifejeződéséről, kereszteztük az *Att-GFP* transzgént homozigóta formában, harmadik kromoszómán hordozó törzset az *OreR* és a *DTS-L3/CyRoi* törzsekhez. A legfeljebb 3 napos egyedeket a *CyRoi* balanszerkromoszóma vesztésre történő szelekciója után három napig 20°C illetve 29°C fokon tartottuk. Az azonos expozícióval készült felvételek (5.B-E ábra) megerősítették a microarray és a qPCR-kísérlet korábbi megállapításait, mivel a vad típusban alacsony hőmérsékleten nagy mennyiségben termelődik az *Att-GFP*, restriktív körülmények között azonban erősen lecsökken. A mutációt hordozó egyedekben ennek éppen a fordítottját figyelhetjük meg, nevezetesen, hogy permisszív hőmérsékleten alacsony, 29°C-on ellenben erősen megnő a termelődő AMP fehérje szintje.



5.B-E ábra GFP-jelölt AMP (Att) kifejeződése a hátsó-középbéli szakaszon a korábban tapasztalt mintázatot követi és ellentétesen változik a vad típusban és a mutánsban; B: +/+;+/Att-GFP, 20°C; C: *DTS-L3*/+;+/Att-GFP, 20°C; D: +/+;+/Att-GFP, 29°C; E: *DTS-L3*/+;+/Att-GFP, 29°C; lépték: 100 μ m

A reaktív oxigéngyökök (ROS) szintje emelkedett a mutánsban

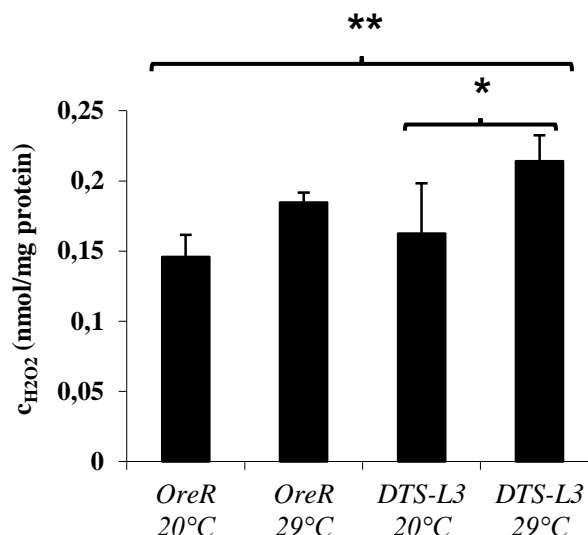
Az antimikrobiális peptidek mellett a muslica kórokozók elleni védekezésének egy másik fegyvere a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelése. Szigorúan szabályozott folyamatok során képződnek, mivel krónikus jelenlétük és túlzott mennyiségük hosszú távon a gazdaállat egészségét is veszélyezteti. Munkánk során két, rendszeresen vizsgált szabadgyök mennyiségét határoztuk meg fiziológias és patológiás körülmények között. Ezek egyike a peroxi-nitrit (6. ábra), mely a mutációt hordozó *DTS-L3* törzsben már alacsony hőmérsékleten is szignifikáns eltérést mutatott a vad típustól, szintje jelentősen emelkedett volt. 29°C-on nevelt egyedekkel megismételve a kísérletet, hasonlóan magas értékeket kaptunk a kontroll és a mutáns törzs esetén is.



6. ábra A peroxi-nitrit (ONOO^-) szintje a vad típusú és a mutációt hordozó állatokban nmol/mg fehérjére vonatkoztatva. Már permisszív hőmérsékleten is szignifikánsan magasabb a peroxi-nitrit szint a mutánsban, ami restriktív körülmények között is megmarad. Restriktív hőmérsékleten látszólag a vad típusban is emelkedik a peroxi-nitrit koncentráció, bár ezen adatok alapján nem szignifikánsan; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ (Közös kísérlet Radics Mónikával)

A másik, általunk vizsgált ROS a hidrogén-peroxid volt (7. ábra). A peroxi-nitrittel ellentétben ennek koncentrációja 20°C-on mindkét törzsben hasonlóan alacsonynak adódott, a környezeti hőmérséklet emelésének hatására pedig egyformán nőtt.

Feltételezzük, hogy a peroxi-nitrit megnövekedett koncentrációja a permisszív körülmények közt nevelkedett mutánsokban hozzájárulhat az egyedek bélflórájának csíraszámában kimutatott csökkenéshez és magyarázatot adhat az AMP-k alacsonyabb szintjére.

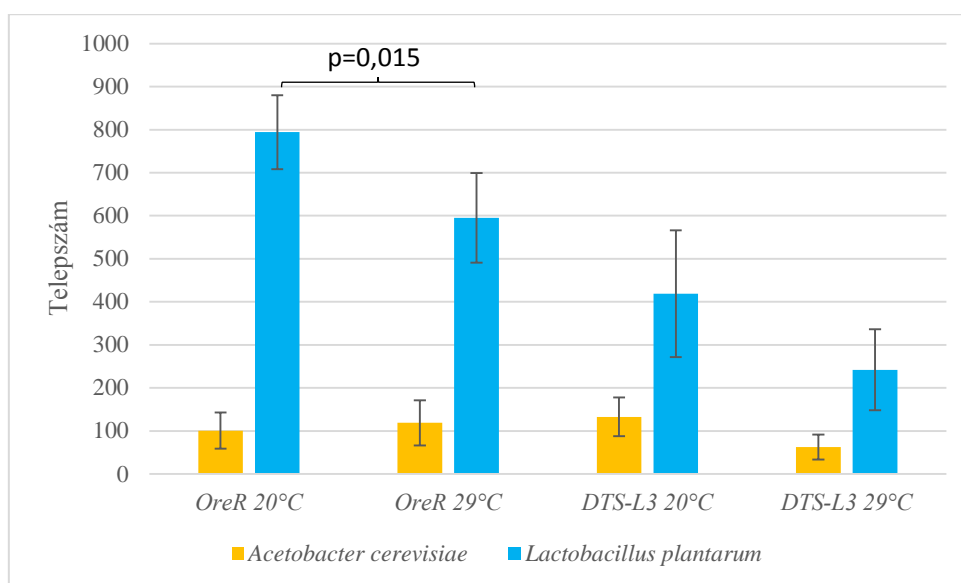


7. ábra A hidrogén-peroxid (H_2O_2) szintje a vad típusú és a mutációt hordozó állatokban nmol/mg fehérjére vonatkoztatva. Míg a vad típusban a hőmérsékletemelés hatására alig változik, addig a mutánsban szignifikánsan nagyobb a hidrogén-peroxid koncentrációja restriktív hőmérsékleten; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$ (Közös kísérlet Radics Mónikával)

A bélflóra összetétele megváltozik a hőmérsékletemelés hatására

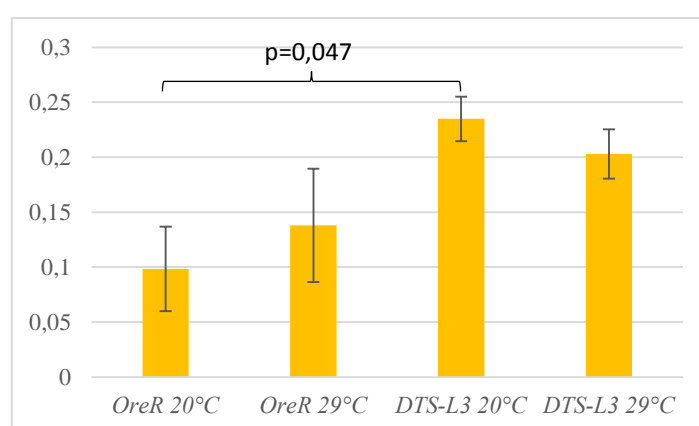
Az antimikrobiális peptidek szintézisének drasztikus megváltozását látva feltételeztük, hogy a kísérleti állatokkal együtt élő, beleikben megtalálható baktériumok populációira is jelentős hatást gyakorol a megváltozott mikrokörnyezet. Ennek felderítése érdekében tenyésztéssel, majd a tiszta telepekből nyert DNS szekvenálásával meghatároztuk a bél mikrobiomjának összetételét, továbbá az egyes fajok csíraszámát.

A vad típusú és a mutáns egyedek bélflórájának vizsgálata két rezidens tagot azonosított: az *Acetobacter cerevisiae*-t és a *Lactobacillus plantarum*-ot. A legmagasabb csíraszámot a permisszív hőmérsékleten nevelt vad típusú egyedek mutatták, ami hősokk hatására szignifikánsan csökkent (8. ábra; *Lactobacillus plantarum*, $p = 0,015$). A vizsgált DTS-L3 (*col4a1*^{G552D2}) mutáns emésztőtraktusából kitenyésztethető telepek száma már 20°C-on is alacsonyabb, mint a vad típusban, azonban 29°C-on tovább csökken, bár ez a különbség a nagy szórások miatt nem éri el a $p = 0,05$ szignifikancia szintet. A szórás ilyen mértékét hasonló kísérletekben más kutatócsoport is észlelte (Broderick és mtsai, 2014). A grafikonon a csészénként kinőtt telepek számát ábrázoltuk, az egy egyedben megtalálható teljes csíraszámhoz ezt az értéket 125-tel kell szorozni.



8. ábra A vad típus (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns bélflórájának összetétele permisszív és restriktív hőmérsékleten (hígítás: 125x)

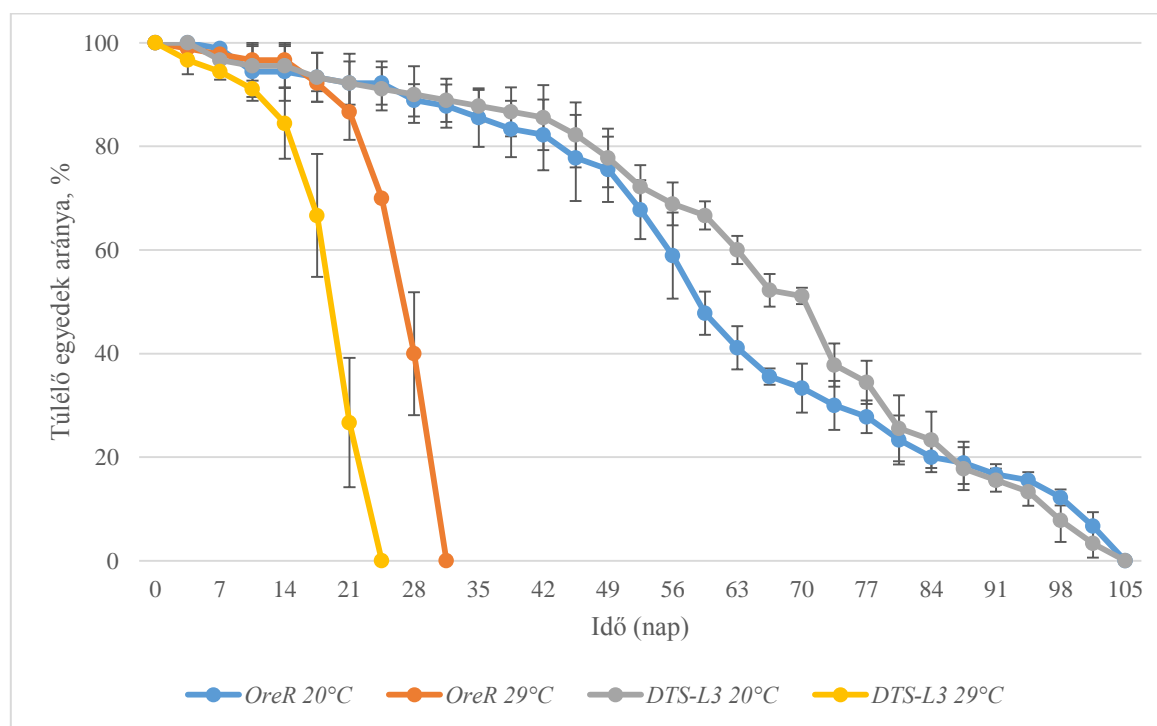
Az *Acetobacter* és a *Lactobacillus* telepek számait összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a vad típusban a kettő aránya alacsonyabb (9. ábra). A hőmérséklet változtatása előidézik ugyan kismértékű különbséget, ez azonban statisztikailag általában nem támasztható alá. A vad típus és a mutáns permisszív hőmérsékleten történő összehasonlítása esetén azonban kimutatható a különbség ($p=0,047$).



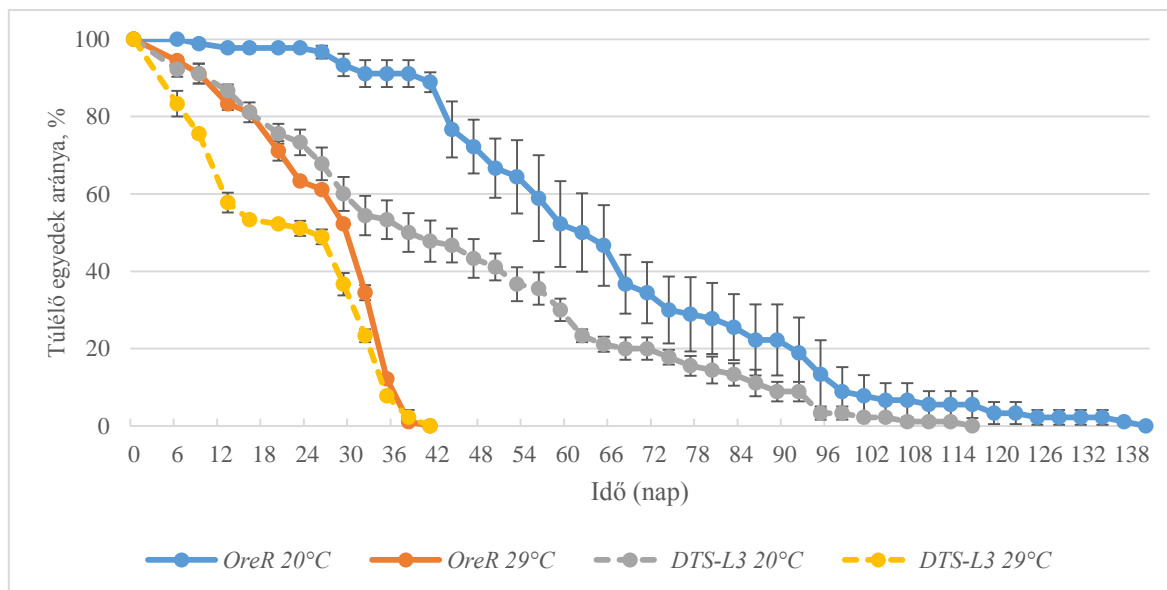
9. ábra *Acetobacter/Lactobacillus* arány a vad típusú (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns legyek béltraktusában különböző hőmérsékleteken

Az antibiotikus kezelés elősegíti a hosszabb túlélést

Az antibiotikus kezelés során arra voltunk kíváncsiak, hogy a bélbaktériumok jelenléte, illetve hiánya hogyan befolyásolja az állatok túlélését (10.A és B ábra). Az alkalmazott széles spektrumú ampicillin és tetraciklin antibiotikumok hatására 20°C-on mind a vad típusú (maximális élettartam: 140 nap, populáció féléletidő: 62 nap), mind a mutáns *DTS-L3* törzsek (maximális élettartam: 116 nap, féléletidő: 38 nap) hosszabb ideig éltek normál táptalajon nevelt társaiknál (*OreR*: 105 nap, féléletidő: 59 nap; *DTS-L3*: 105 nap, féléletidő: 70 nap), noha a populáció létszámának feleződési ideje rövidebb volt a kezelt *DTS-L3* törzsben. Restriktív hőmérsékleten hasonló tendenciát látunk: az antibiotikummal kezelt *OreR* és a mutációt hordozó törzs is legfeljebb 41 napig élt (*OreR* féléletidő: 29-30 nap; *DTS-L3* féléletidő: 24-25 nap), szemben az antibiotikumot nem tartalmazó táptalajon tartott legyekkel (*OreR*: 32 nap, féléletidő: 27 nap; *DTS-L3*: 25 nap, féléletidő: 19-20 nap; Popovics Nikolett mérése). Megállapítható, hogy magasabb hőmérsékleten jótékonyan hat az antibiotikum táptalajba való adagolása a maximálisan elérhető élettartamra.



10.A ábra A vad típusú (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns legyek túlélése különböző hőmérsékleteken (Popovics Nikolett mérése)

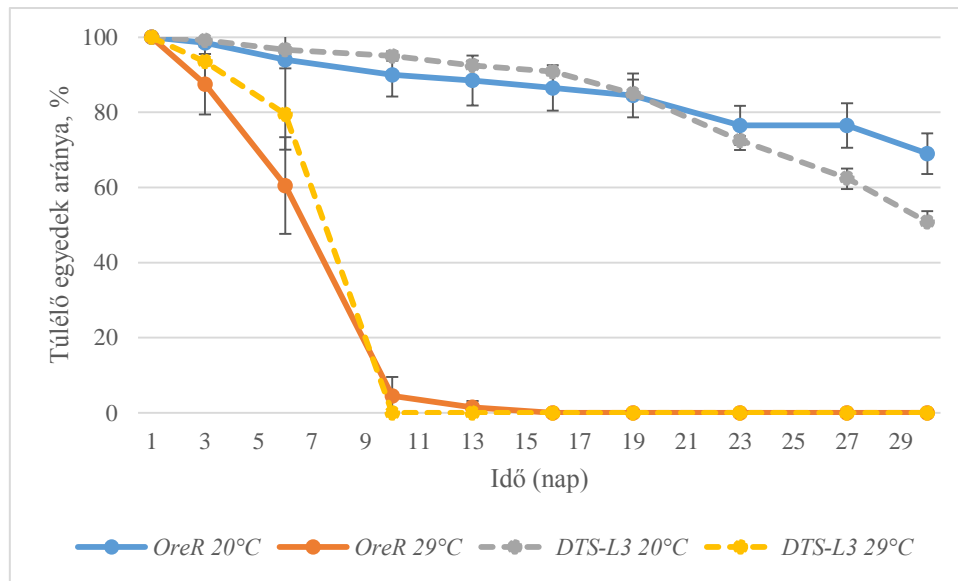


10.B ábra Az antibiotikus kezelés hatása a vad típusú (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns legyek túlélésére

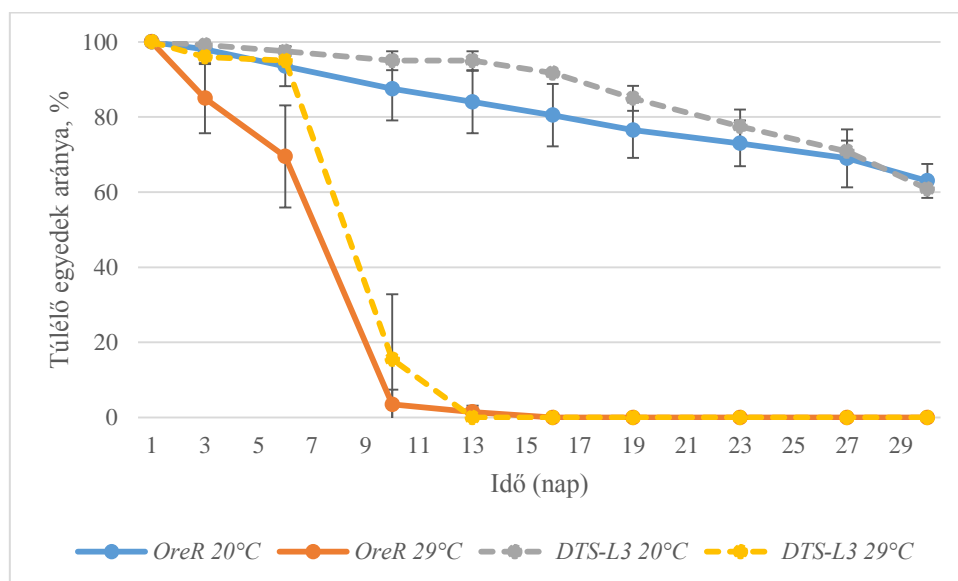
Egyfajta belső kontrollként a korábbi protokoll szerint felboncoltunk több, az előző kísérletben használt antibiotikumot tartalmazó táptalajon három napig tartott egyed, majd a béltraktusukból készített homogenizátumot táptalajra szélesztettük. Az eredmény meggyőzően támasztja alá a kezelés baktericid hatását, ugyanis egyetlen alkalommal sem nőtt semmilyen baktériumtelep a Petri-csészéken.

A túl magas telepszám végzetes restriktív hőmérsékleten

Megvizsgáltuk továbbá, hogy mi történik, ha az előző pontban ismertetett kísérlettel ellentétben nem csökkentjük, hanem növeljük a baktériumok csíraszámát. Ezt a hatást a korábban izolált baktériumokkal (*Acetobacter cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*) fertőzött táplálék etetésével kívántuk demonstrálni a vad típusú (*OreR*) és a *DTS-L3* mutánsban, permisszív és restriktív hőmérsékleteken. Ennek érdekében a baktériumok eltérő csíraszámú tenyészetével (11.A és B ábra: 10^8 , 12.A és B ábra: 10^7) inokuláltuk a táptalajt, majd monitoroztuk a túlélést. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott baktérium- és légytörzstől függetlenül, 10^8 csíraszám mellett, restriktív hőmérsékleten a kolónia a tizedik napra teljesen kipusztult.



11.A ábra A vad típus (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns túlélése 10^8 számú *Acetobacter cerevisiae* etetése esetén

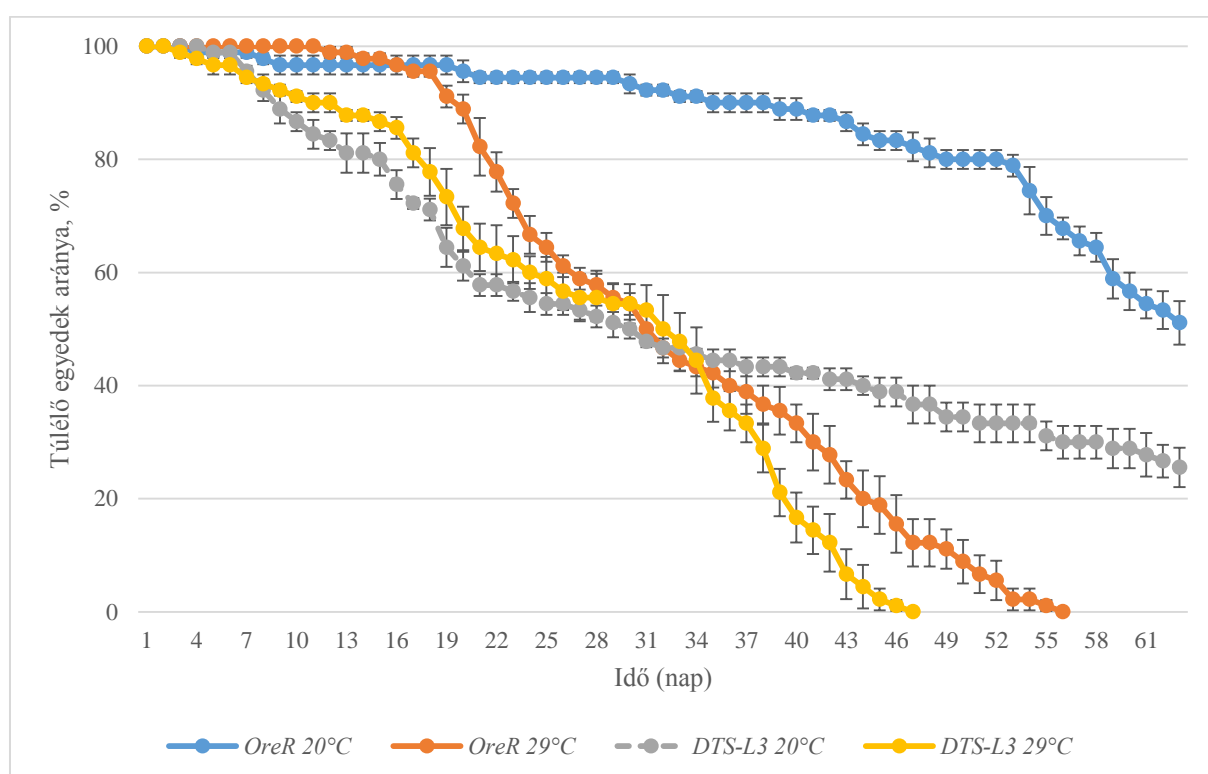


11.B ábra A vad típus (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns túlélése 10^8 számú *Lactobacillus plantarum* etetése esetén

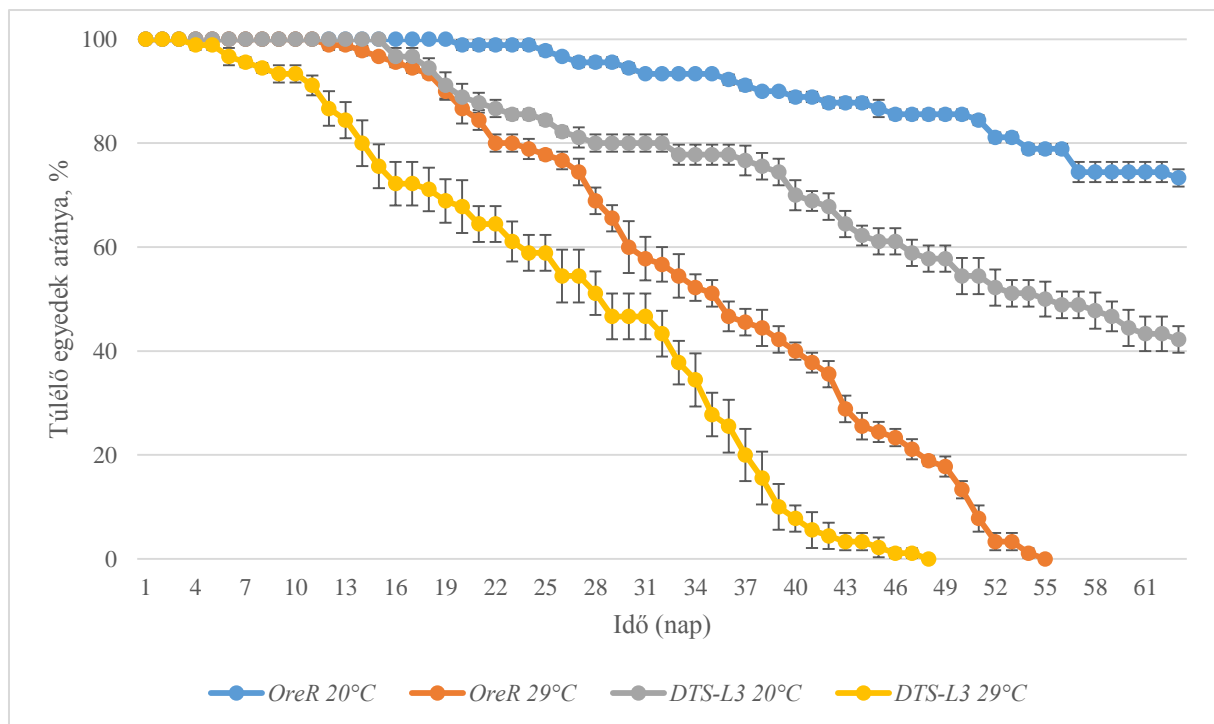
A kísérletet 10^7 számú baktériumsejttel megismételve (12.A és B ábra) eltérő eredményeket kaptunk: 29°C fokon a vad típusú törzs féléletideje az *Acetobacter cerevisiae* baktériummal etetve 31 nap (maximális élettartam: 56 nap), amihez nagyon hasonló a *DTS-L3* törzsé: 30, illetve 32 nap permisszív, illetve restriktív (maximális élettartam: 47 nap) hőmérsékleti viszonyok között.

A *Lactobacillus plantarum* tejsavbaktériummal végzett inokulálás eredményeképp a maximális élettartamok hasonlóak voltak (*DTS-L3*, 29°C: 48 nap és *OreR*, 29°C: 55 nap), mint az *Acetobacter cerevisiae* esetén. A féléletidők (*DTS-L3*, 29°C: 28 nap és *OreR*, 29°C: 35 nap) sem esnek távol az *Acetobacter cerevisiae*-vel végzett kísérletek eredményeitől, kivéve a *DTS-L3* törzs 20°C-os értékét (55 nap), ami majdnem duplája az előbbinek.

A méréseket végrehajtottuk 10^5 számú baktériumsejttel használva is, ami nagyon hasonló túlélési görbéket eredményezett, mint a 10^7 -en számú sejttel végzett kísérletek. Ezen adatok nem járulnak hozzá új információval a vizsgált jelenség megértéséhez, ezért nem képezik részét a dolgozatnak.



12.A ábra A vad típus (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns túlélése 10^7 számú *Acetobacter cerevisiae* etetése esetén



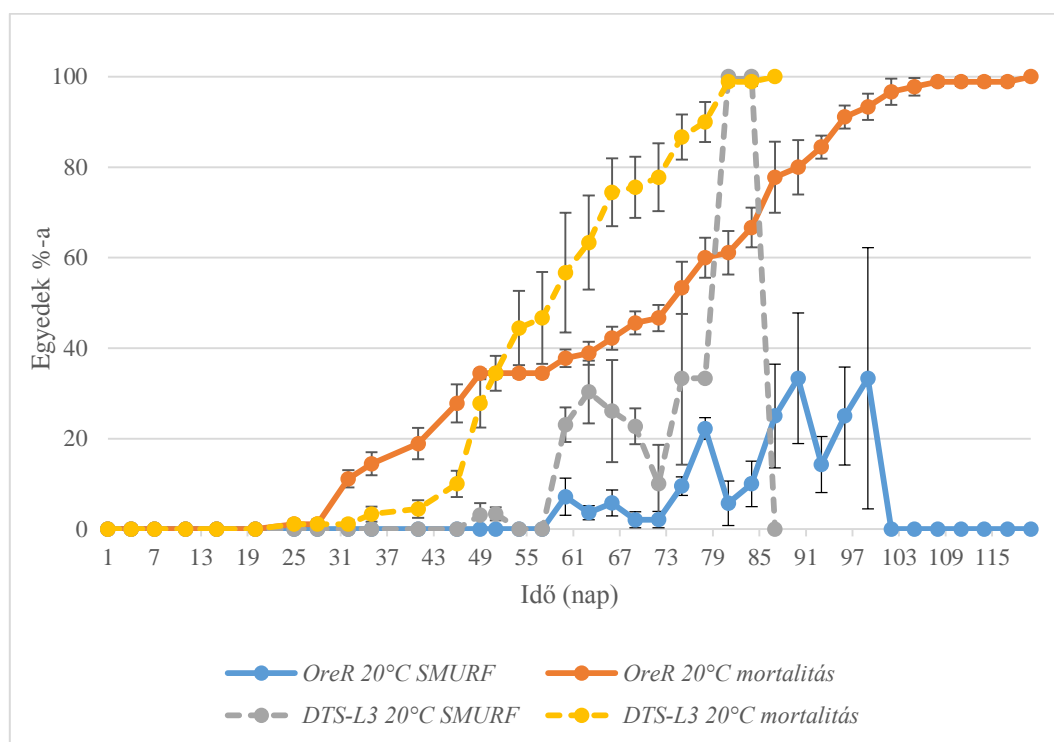
12.B ábra A vad típus (*OreR*) és a *DTS-L3* mutáns túlélése 10^7 számú *Lactobacillus plantarum* etetése esetén

A *col4a1* génben bekövetkező *DTS-L3* mutáció intesztinális diszfunkciót okoz, megjelenik a „SMURF” fenotípus

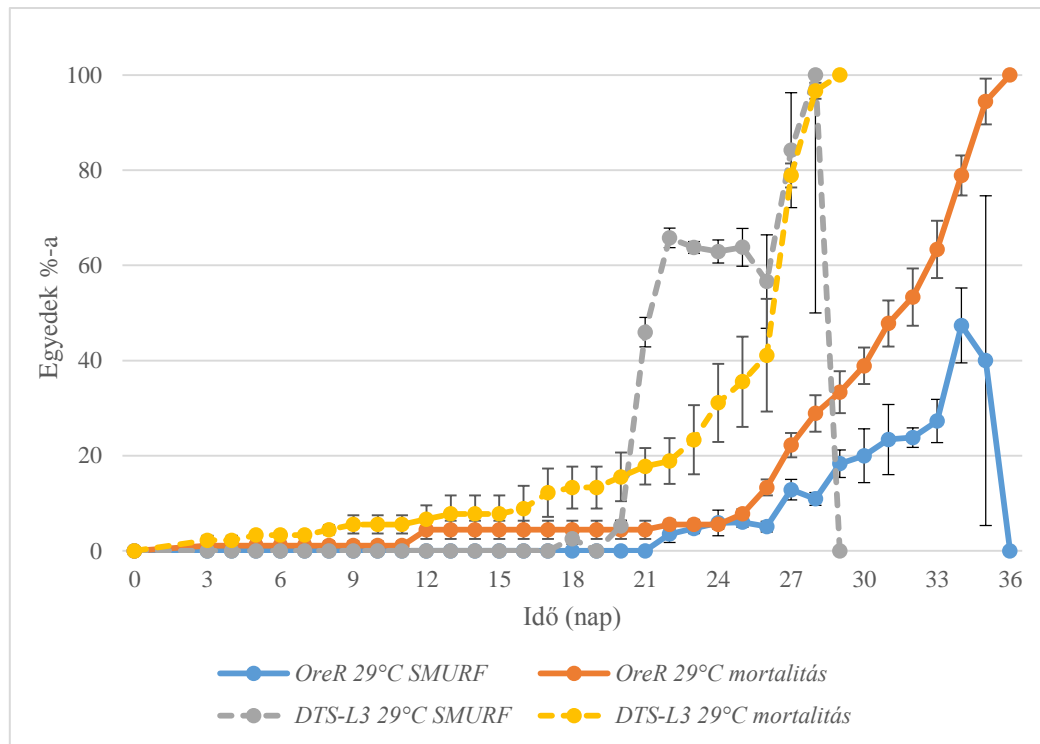
Hipotézisünk szerint a mátrixba beépülő hibás COL4A1 fehérjék megváltoztatják annak szerkezetét és kihatnak többek között a mátrix és az epitélréteg kapcsolódásának erősségére is. Ez előidézheti az epitélsejtek elválását a bazális laminától, amit a sejtek pusztulása követhet. Ha ez a bélcsatornában játszódik le, akkor idővel annak határoló funkciója is meggyengül, ami a béltartalomnak közvetlenül a testüregbe szivárgásához vezethet. Feltevésünk bizonyításának legegyszerűbb módja, ha egy olyan festéket juttatunk a bélbe, ami normál körülmények között nem transzportálódik a bélfalon keresztül és nem is metabolizálódik. Erre a célra a patentkék V etanolos oldatát használtuk: a táptalajba kevert ételfesték táplálkozás után jól láthatóan kirajzolta az állatok bélcsatornáját. Ha a színezék a bélben átjutva a testüregbe került, SMURF fenotípus megjelenéséről beszélünk.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a permisszív hőmérsékleten tartott *OreR* legyek kis részében jelent meg a festék okozta kék szín a bélben kívül, akkor is csak életük utolsó harmadában (13. ábra). A *DTS-L3* mutánsban már a hatvanadik napon megnő a SMURF fenotípust mutató legyek aránya; az életük vége felé közeledve ez az érték eléri a

100%-ot, azonban érdemes megjegyezni, hogy itt már csak 1-2 egyed élt, ez magyarázza a rendkívül magas értéket. Korábban bemutattuk, hogy a legyek élettartama 29°C-on sokkal rövidebb, mintegy harmada, negyede a permisszív hőmérsékleten tapasztalhatónak. Ezenfelül megállapíthatjuk, hogy a SMURF legyek számaránya jelentősen magasabb a mutánsokban, ami ráadásul megelőzi a nagyarányú pusztulást, ellentétben a vad típusú egyedekkel, ahol ez az érték alacsony. A teljes populáció elhullása a 29. (*DTS-L3*) és a 36. napon (*OreR*) következik be (14. ábra).



13. ábra A SMURF fenotípus megjelenése és a mortalitás 20°C-on a vad típusban (*OreR*) és a *DTS-L3* mutánsban



14. ábra A SMURF fenotípus megjelenése és a mortalitás 29°C-on a vad típusban (*OreR*) és a *DTS-L3* mutánsban

Diszkusszió

A közelmúltban leírtuk, hogy a *col4a1* IV-es típusú kollagén gén kondicionális mutációját hordozó *Drosophila melanogaster* törzsben a sejtek alapmembrántól való elválása előbbiek nagymértékű pusztulását okozza a közös petevezető harántcsíkolt-, valamint a bél simaizomzatában és annak epitélrétegében (Kelemen-Valkony és mtsai, 2012). Ebből kiindulva feltételeztük, hogy a mutánsban krónikus gyulladás alakul ki, az immunrendszer ebből kifolyólag erősen aktivált állapotban van. A mutáns lárvák bélcsatornájának vizsgálata divertikulumok jelenlétét mutatta ki, amik környezetében a sejtmagok TUNEL-pozitívak restriktív hőmérsékleten; permisszív körülmények között ez a jelenség nem detektálható.

Egyetlen aminosav cseréje az ECM valamely alkotójában nagyban befolyásolhatja a mátrix fiziko-kémiai tulajdonságait, a sejt-mátrix kapcsolatokat, ezáltal a hozzá kapcsolódó sejtek alakját, működését (Järveläinen és mtsai, 2009). Továbbá a kollagén triplahélix szorosan illeszkedő láncainak bármelyikében bekövetkező aminosavcsere hatással van a komplex negyedleges szerkezetére, nagy valószínűséggel lokálisan csökkenti az olvadáspontot. Ezt a jelenséget az oszteogenezis imperfektában és az Ehlers-Danlos-szindrómában mint kollagénhez köthető betegségekben korábban leírták (Dalglish, 1998). *Caenorhabditis elegans*-ban kimutatták, hogy az erős fenotípust előidéző mutációk a COL4A2 fehérje termikusan kevésbé stabil régióira lokalizálódnak (Sibley és mtsai, 1994).

A fehérjeszekvenciák elemzése a mutációs helyek ismeretében arra enged következtetni, hogy a vizsgálat alá vont törzseink egy részének fenotípusos megjelenése összefüggésbe hozható a kollagén hármas hélixének helyi olvadáspont csökkenésével, illetve a közeli integrinkötő helyek térbeli szerkezetének megváltozásával. Kísérleteink elsősorban a p.G552D mutáció okozta patológiás elváltozások megértésére koncentráltak. Ezen mutáció közelében két cisztein is található a COL4A1 és a COL4A2 láncban egyaránt, amik a többi fehérje illeszkedő szakaszainak ciszteinjeivel feltehetően diszulfid-hidakat képeznek a triplahélixben. Az aminosavcsere következtében előfordulhat, hogy a stabilitásért felelős diszulfid-hidak nem, vagy csak a normálisnál lassabban alakulnak ki. Korábban megfigyelték, hogy a glicinek kicserélése nagyobb térkitöltésű oldallánccal rendelkező csoportra okozhatja a triplahélix feltekeredésének lelassulását, a proteázokkal szembeni érzékenység növekedését, esetlegesen a protomer meghajlását (Hwang és Brodsky, 2012; Srinivasan és mtsai, 2009). Ez a fehérjék intracelluláris tartózkodási idejének növekedéséhez, következésképpen ER-

stresszhez vezethet, hasonlóan a *Caenorhabditis elegans*-ban látottakhoz (Gupta és mtsai, 1997). Ezek a szubsztitúciók tehát nagyobb térkitöltésű és/vagy poláros aminosavak beépülését okozzák, amik a natív harmadlagos és negyedleges szerkezet felbomlásához vezethetnek. A jövőben érdemes lenne megvizsgálni az integrinkötés erősségének megváltozását a megfelelő mutánsokban, például a bélben kifejeződő *Integrin β v* (*Itg β v*) működésén keresztül, ami az apoptotikus sejtek és a baktériumok fagocitózisában játszik szerepet (Yee és Hynes, 1993).

A többsejtű eukariótákat folyamatos kihívások elé állítja saját rezidens mikrobiális flórájuk. A lehetséges fertőzések leküzdésére a védekezési mechanizmusok gyorsan evolválódó, széles skáláját fejlesztették ki az élőlények. Az ecetmuslica kizárólag veleszületett immunitással rendelkezik. A patogének elleni harcban a gazdaszervezet egyik fizikai védelmi vonalát a külső és belső testfelszínek epitelsejt rétege jelenti, ami megtalálható többek között a trachea- és a bélrendszerben is. Ezen sejtréteg immunogén hatásra antimikrobiális peptidek és reaktív oxigéngyökök szintézisével válaszol, ami a behatás időtartamával arányosan károsítja magát az epitéliumot is.

Mivel a muslicában a gyulladásos állapot az AMP-k szintézisének megemelkedésével jár, feltettük a kérdést, hogy vajon a IV-es típusú kollagén mutánsokban tapasztalható-e hasonló jelenség restriktív hőmérsékleten. Microarray és qPCR kísérleteink igazolták bizonyos AMP gének (*Metchnikowin*, *Diptericin*, *Diptericin B*, *Attacin C*, *Attacin A*, *edin*) túlexpresszióját a p.G552D mutációt hordozó törzsben. A vad típusú kontrollban éppen ellentétes hatást tapasztaltunk: az említett gének kifejeződése csökkent a hősokkot követően. Az immunrendszer aktivitásának fokozódását támasztja alá a microarray adatait alapul vevő génontológiai elemzés is, mely az immunválasszal kapcsolatos biológiai folyamatokat gyűjtő kategóriák előfordulásának megnövekedését jelzi. Ezen változások fehérjeszintű megnyilvánulását demonstráltuk az Att-GFP fúziós fehérjét szintetizáló mutánsok emésztőszervrendszerének mikroszkópos összehasonlító vizsgálatával.

Az antimikrobiális peptidek a muslica veleszületett immunrendszerének alappillérei, hatásmechanizmusuk alapján több csoportba oszthatjuk azokat. Támadhatják a sejtmembránt a) pórust képezve, b) detergensként szerkezetileg és funkcionálisan tönkretéve azt, vagy c) a mikrobiális sejtfal alkotóinak keresztkötéseit kialakító enzimek működését gátolva. A sejtbe jutva akadályozhatják d) a DNS-, e) az RNS- vagy f) a fehérjeszintézist, g) a chaperonok működését, vagy h) a mitokondriumban a sejtlégzés megzavarásával ROS termelést

indukálnak, esetleg *i*) ezen organellum membránját károsítják (Peters és mtsai, 2010). Modellünk alkalmas lehet ezen kérdések további, beható vizsgálatára.

Annak érdekében, hogy egy újabb nézőpontból vehessük szemügyre a mutáció hatására bekövetkező fiziológiás elváltozásokat, méréseket végeztünk a *muslica* immunrendszerének egy másik ágát képviselő reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésével kapcsolatban. Kísérleteink során két, gyakran tanulmányozott szabadgyök koncentrációját mértük meg. Míg a peroxi-nitrit szintje már permisszív hőmérsékleten is szignifikánsan magasabb volt a mutánsban – ami restriktív körülmények között is emelkedett maradt – addig a vad típusban látszólag csak restriktív hőmérsékleten nő a peroxi-nitrit koncentráció, bár ezen adatok alapján nem szignifikánsan. A H_2O_2 mennyisége a vad típusban a hőmérséklet emelés hatására alig nő, addig a mutánsban szignifikánsan nagyobb a hidrogén-peroxid koncentrációja restriktív hőmérsékleten. Feltételezhető, hogy a peroxi-nitrit megnövekedett koncentrációja a mutánsban hozzájárulhat a 20°C-on nevelkedett egyedek bélflórájának csíraszámában kimutatott csökkenéshez. Fontos kiemelni ezt a megfigyelést, mivel egy lehetséges magyarázatot ad az antimikrobiális peptidek mutánsban tapasztalható csökkent termelődésére alacsony hőmérsékleten.

A bélflóra összetételének vizsgálata az *Acetobacter cerevisiae* és a *Lactobacillus plantarum* jelenlétét igazolta, melyek CFU értékei restriktív körülmények között csökkentek a vad típusban és a mutánsban egyaránt (Crotti és mtsai, 2010).

Az antibiotikumok keverékét tartalmazó táptalajon nevelt egyedek élettartama törzstől függetlenül hosszabb maximális élettartammal jellemezhető, bár a mutációt hordozó *DTS-L3/CyRoi* törzs féléletideje rövidebb volt alacsony hőmérsékleten, míg 29°C-on egyértelműen javult az állatok túlélése.

A mutáns élettartama erősen lecsökkent 29°C-on. Az izolált bélbaktériumok 10^8 sejtszámú tenyészetének orális adminisztrációjára – szájon át történő etetésére – a vad típusú és a mutáns állatok egyaránt érzékenyek, jelentősen csökkent az élethosszuk. Alacsonyabb csíraszám mellett jelentősen javult a kísérleti populációk túlélése, ami az előbbi megfigyelésekkel összevetve mutatja, hogy létezik olyan mikroba terhelés, ami rövidtávon a legyek elhullásához vezet.

A hősokk a tápcsatorna barrier funkciójára is hatással volt, amit egy fel nem szívódó és nem metabolizálódó kék ételfesték etetésével demonstráltunk: ha ép a gátrendszer, akkor kizárólag a belek festődnek, ellenkező esetben a testüregben keringő hemolimfa is kékre színeződik, megjelenik a SMURF fenotípus.

A mutáns COL4A1 jelenléte a – normál esetben öregedés során megfigyelhető – SMURF fenotípus korai megjelenéséhez és intesztinális diszfunkcióhoz vezetett restriktív hőmérsékleten, fiatalabb egyedekben, ami jelentősen csökkentette élettartamukat.

A dolgozat lényegét egyetlen mondatban sűrítve kijelenthetjük, hogy a *col4a1* mutánsokban a megnövelt hőmérséklet hatására az AMP-k kifejeződése és a reaktív oxigén gyökök szintje igen nagymértékben megemelkedett, továbbá jelentős sejtpusztulás volt megfigyelhető, kapcsolatot teremtve ezáltal a IV-es típusú kollagén génjeit érintő mutációk, valamint az intesztinális diszfunkció és az AMP túlexpresszió között, jelezve a COL4A1 fehérje immunfolyamatokra kifejtett közvetett hatását ami végül az állatok korai pusztulásához vezetett.

Úgy tűnik, a mátrix–integrin–intracelluláris struktúrfehérje vonal bármely eleme, vagy azok fiziológias működésében szerepet játszó protein hibás működése a mutánsainkban megfigyelhetőhöz hasonló tünetek megjelenéséhez vezethet. Az integrin egyik aktivátora, a *Zasp* ebben a folyamatban játszik szerepet, mutáns változata emberben kardiomiopátiát, illetve miofibrilláris miopátiát okoz (Bouaouina és mtsai, 2012). Annak eldöntése azonban, hogy a kísérleteinkben megfigyelt változások apoptózis, nekrozis vagy nekroptózis (Dagenais és mtsai, 2014) eredményeként jönnek létre, meghaladja laboratóriumunk mind fizikai, mind anyagi lehetőségeit.

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk

Folyóiratban megjelent cikk

Márton Kiss, András Attila Kiss, Monika Radics, Nikoletta Popovics, Edit Hermes, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: *Drosophila* type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction; Matrix Biology, January 2016. 49:120-131.; IF(2016): 7,40

Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiha, J., Kiss, A., Bircher, U., Szidonya, J., Maróy, P., Juhász, G., Komonyi, O., Csiszár, K., Mink, M.: *Drosophila* basement membrane collagen *col4a1* mutations cause severe myopathy; Matrix Biology, Volume 31, Issue 1, January 2012, Pages 29-37; IF(2012): 3,19

Folyóiratban megjelent előadás kivonat

Márton Kiss, Ildikó Kelemen-Valkony, Brigitta Kiss, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: Muscle dystrophy is triggered by type IV collagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in *Drosophila*. Acta Biochimica Polonica, 2012, IF (2012): 1,185

Mátyás Mink, Judit Csiha, Orbán Komonyi, Márton Kiss, Ildikó Kelemen-Valkony, Katalin Csiszár: Dominant *col4a1* *Drosophila* mutants as potential models for mammalian/human Col4a1/COL4A1 lesions /Folia Medica Cassoviensia, Tomus 66, No. 1, Suppl. 1, 2011/

Könyvfejezet

Ildikó Kelemen-Valkony, Márton Kiss, Katalin Csiszár, Mátyás Mink: Inherited Myopathies. In: Myopathies: New Research. Eds: Howard S. Washington and Chris E. Castillo Jimenez, Nova Publishers, 2012, ISBN: 978-1-62257-372-1.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mink Mátyásnak, hogy lehetőséget adott bekapcsolódni a csoport munkájába és a megszabott kereteken túl még „játszani is engedett”.

Köszönöm jelen dolgozat bírálóinak, hogy elfogadták a felkérést munkám revíziójára és jobbitó tanácsaik segítségével emelik írásom színvonalát.

Köszönöm Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a doktori iskola vezetőjének, hogy kitartóan támogatott a disszertáció elkészültében, mely segítség nélkül nem írhatnám meg ezt a fejezetet (sem).

Köszönöm Dr. Doug Gouldnak és munkatársainak Dr. Mao Maonak és Dr. Marion Jeanne-nak, hogy egy felejthetetlen időszakot tölthettem velük San Franciscóban, miközben rengeteget tanultam tőlük.

Köszönettel tartozom Dr. Bodai Lászlónak a qPCR mérések, Dr. Ács Norbertnek és Dr. Kocsubé Sándornak a szekvenálásban és a genotipizálásban, Dr. Puskás Lászlónak és Dr. Zvara Ágnesnek a microarray kísérletekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm Prof. Dr. Andó Istvánnak és Dr. Csordás Gábornak a kísérletekhez biztosított *Att-GFP* törzset.

Köszönöm korábbi „szobatársaimnak”, Huszár Tündének, Dr. Ráczné Dr. Ordas Anitának, Dr. Rácz Péternek, hogy a Földtől legelrugaskodottabb kérdéseimre is legjobb tudásuk szerint türelmesen válaszoltak.

Köszönöm Dr. Csiszár Katalinnak a megbeszélések során felvetett szakmai javaslatait és a kéziratokra fordított alapos és lelkiismeretes munkáját.

Köszönöm továbbá Balogné Dosztig Monikának, Csukonyi Évának, Deák Ágotának, Hajdúné Tóth Melindának, Kiss Andrásnak, Radics Mónikának, Popovics Nikolettának, Dr. Sinka Ritának, Valkonyné Kelemen Ildikónak és a Genetikai Tanszék dolgozóinak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk bizalommal és hogy munkám során támogattak.

Köszönöm Dr. Takács Sándornak az előbbieken felül a közös tanítás élményét és persze az együtt legurított söröket.

Köszönöm szüleimnek, hogy immáron jó 33 éve zigótát képeztek és a kialakuló hólyag- majd szedericsírárt, végül emberi lényt fizikailag és szellemileg erejükön felül táplálták. Köszönöm a testvéreimnek is, akik talán nem is gondolták, hogy ők is részesei ennek a történetnek.

És végül köszönöm a barátaimnak, akik nélkül ez az „út” még rögzösebb és nagyon egyhangú lett volna...

... és köszönöm a Nemzeti Kiválóság Programnak, az OTKA-nak és a Richter Gedeon NyRt-nek, hogy ösztöndíjaik segítségével befejezhettem munkámat.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

A kutatás eszközbeszerzése az OTKA NN108283 által biztosított forrásból valósult meg.

Magyar nyelvű összefoglaló

Az extracelluláris mátrix (ECM) a sejten kívüli tér makromolekuláinak rendezett hálózata, amely a sejtek migrációját, fejlődését és túlélését biztosítja, kapcsolatot teremt a sejtek között, szövetté szervezi azokat, és részt vesz a kommunikációban. A többsejtű állati lét szinte elképzelhetetlen lenne nélküle. Az ECM fajonként és szervenként rengeteg különböző molekulából állhat, felépítésében mégis oroszlánrészt vállalnak a kollagén szupercsalád tagjai. Ezeken kívül megtalálhatóak benne a lamininek, a proteoglikánok, a glükózaminoglikánok, a fibronectin, a perlekán, a SPARC, a nidogén és gerincesekben az elasztin is.

Az ECM egy speciális változata a bazális membrán, ami egyfajta határoló funkciót lát el. Szintézise általában az általa elválasztott két térrész sejtjei (pl. epitel, kötőszövet) együttes erőfeszítésének eredménye, muslicában azonban elsősorban a hemociták termelik. A bazális membrán két nagyobb egységre bontható: a bazális laminára, és a retikuláris laminára. A két réteget VII-es típusú kollagén kapcsolja össze.

A kollagén egy nagyon érdekes fehérje (Pauling és mtsai, 1951). A kollagén szupercsaládot kilenc, különböző molekuláris szerkezetű és különböző funkciókat ellátó kollagén család alkotja. A kollagén molekula az N-terminális 7S doménból, a kollagén alegységből és a C-terminális NC1 doménból épül fel. A kollagén trimer összeszerelődése során három kollagén molekula, azaz három fehérjeszál alkot egy protomert. Részletes vizsgálatok kimutatták, hogy a triplahélix összeszerelődését a C-terminális NC1 domén irányítja. Az említett terminális domének feladata az egyes triplahelikális protomerek összekapcsolása. Az így kialakuló hálózat mintázata a drótkerítésre emlékeztet. Az élővilágban legelterjedtebb az $(A1)_2(A2)$ - $(A1)_2(A2)$ hálózat.

A *Drosophila melanogaster* IV-es típusú kollagénjeit a *col4a1* és a *col4a2* gén kódolja. A vizsgált törzsek a *col4a1* gén domináns, meleg- vagy hidegérzékeny (dominant temperature sensitive, DTS) alléljeit hordozzák. A mutánsokat etil-metán-szulfonát (EMS) mutagenézissel állították elő. A létrehozott *l(2)25Ca DTS/CyRoi* (meleg-) és az *l(2)25Ca DCS/CyRoi* (hidegérzékeny) heterozigóták, amik magas, illetve alacsony hőmérsékletre érzékenyek, restriktív körülmények között elpusztulnak. A *DTS/DTS* homozigóták még permisszív körülmények között sem életképesek, embriotálisak.

A kollagének poszt-transzlációs módosításában a lizin-hidroxilázok, a prolin-hidroxilázok, a lizil-oxidázok, a mátrix-metalloproteázok és a peroxidazin jut fontos szerephez.

A IV-es típusú kollagén betegsége az Alport-szindróma, ami hematuriával jár, tünetei továbbá a vakság és a sükettség. A Goodpasture-szindróma a vese és a tüdő COL4A3 láncának autoimmun betegsége. A HANAC-szindróma „tekervényes” retinális artériák, agyi aneurizmák, a vese szöveteinek abnormális fejlődésére visszavezethető vérvezelés, ciszták és izomgörcsök „képében” jelentkeznek. A Walker-Warburg-szindróma egy szemfejlődési rendellenességekkel, izomdisztrófiával és idegsejt migrációs problémákkal jelentkező recesszív genetikai betegség. Amennyiben az érfal vérnyomással szembeni ellenállása meggyengül, az a születés körüli időszakban elszenvedett agyvérzésre és porenkefáliára hajlamosít. X-hez kötött süketséget okozhat a *COL4A6* gén némelyik mutációja. Az ASD (anterior segment dysgenesis) egy több betegséget magában foglaló megnevezés, aminek tünetei a szemfejlődési rendellenességek okozta zöldhályog és látásvesztés.

A közelmúltban leírtuk, hogy a *col4a1* IV-es típusú kollagén gén kondicionális mutációját hordozó *Drosophila melanogaster* törzsben a sejtek alapmembrántól való elválása azok nagymértékű pusztulását okozza a közös petevezető harántcsíkolt-, valamint a bél simaizomzatában és annak epitélirétegében (Kelemen-Valkony és mtsai, 2012). Ebből kiindulva feltételeztük, hogy a mutánsban krónikus gyulladás alakul ki, az immunrendszer ebből kifolyólag erősen aktivált állapotban van. A mutáns lárvák bélcsatornájának vizsgálata divertikulumokat mutatott ki, amik környezetében a sejtmagok TUNEL-pozitívak restriktív hőmérsékleten; permisszív körülmények között ez a jelenség nem detektálható.

A többsejtű eukariótákat folyamatos kihívások elé állítja saját rezidens mikroflórájuk. A lehetséges fertőzések leküzdésére a védekezési mechanizmusok széles skáláját fejlesztették ki az élőlények. Az ecetmuslica kizárólag veleszületett immunitással rendelkezik. A patogének elleni harcban a gazdaszervezet első, fizikai védelmi vonalát a külső és belső testfelszínek epitélsejt rétege jelenti, ami megtalálható többek között a trachea- és a bélrendszerben is. Ezen sejtréteg immunogén hatásra antimikrobiális peptidek és reaktív oxigéngyökök szintézisével válaszol, ami a behatás időtartamával arányosan károsítja az epitéliumot.

Mivel a muslicában a gyulladásos állapot az AMP-k szintézisének megemelkedésével jár, feltettük a kérdést, hogy vajon a IV-es típusú kollagén mutánsokban tapasztalható-e

hasonló jelenség restriktív hőmérsékleten. Microarray és qPCR kísérleteink igazolták bizonyos AMP gének (*Metchnikowin*, *Diptericin*, *Diptericin B*, *Attacin C*, *Attacin A*, *edin*) túlexpresszióját. A vad típusú kontrollban éppen ellenkező hatást tapasztaltunk, az említett gének kifejeződése csökkent a hősokkot követően, amit tovább erősített az Att-GFP fúziós fehérjét kifejező egyedekkel végzett vizsgálat. Az elvégzett génontológiai elemzés és a megváltozott kifejeződésű gének szervspecifikus termelődését összefoglaló táblázatok további betekintést nyújtanak a tárgyalt immunfolyamatok részleteibe.

Kísérleteink során két, gyakran tanulmányozott szabadgyök koncentrációját vizsgáltuk meg. Míg a peroxi-nitrit szintje már permisszív hőmérsékleten is szignifikánsan magasabb volt a mutánsban – ami restriktív körülmények között is emelkedett maradt – addig a vad típusban látszólag csak restriktív hőmérsékleten nő a peroxi-nitrit koncentráció, bár ezen adatok alapján nem szignifikánsan. A H₂O₂ mennyisége a vad típusban a hőmérséklet emelés hatására alig nő, addig a mutánsban szignifikánsan nagyobb a hidrogén-peroxid koncentrációja restriktív hőmérsékleten. Feltételezhető, hogy a peroxi-nitrit megnövekedett koncentrációja a mutánsban hozzájárulhat a 20°C-on nevelkedett egyedek bélflórájának csíraszámában kimutatott csökkenéshez.

A bélflóra összetételének vizsgálata az *Acetobacter cerevisiae* és a *Lactobacillus plantarum* jelenlétét igazolta, melyek CFU értékei restriktív körülmények között csökkentek a vad típusban és a mutánsban egyaránt.

Az ampicillin és tetraciklin antibiotikumok keverékét tartalmazó táptalajon nevelt egyedek élettartama törzstől függetlenül hosszabb maximális élettartammal jellemezhető, bár a mutációt hordozó *DTS-L3/CyRoi* törzs féléletideje rövidebb volt alacsony hőmérsékleten, míg 29°C-on egyértelműen javult az állatok túlélése.

A mutáns élettartama erősen lecsökkent 29°C-on. Az izolált bélbaktériumok tenyésztésének orális adminisztrációjára – szájon át történő etetésére – a vad típusú és a mutáns állatok egyaránt érzékenyek, jelentősen csökkent az élethosszuk. Alacsonyabb csíraszám mellett jelentősen javult a kísérleti populációk maximális túlélése, ami egy felső tűrőképességi küszöbérték meglétére utalhat.

A mutáns COL4A1 jelenléte a – normál esetben öregedés során megfigyelhető – SMURF fenotípus megjelenéséhez és intesztinális diszfunkcióhoz vezetett restriktív hőmérsékleten, fiatal egyedekben, ami jelentősen csökkentette élettartamukat.

A *col4a1* mutánsokban a megnövelt hőmérséklet hatására az AMP-k kifejeződése és a reaktív oxigén gyökök szintje igen nagymértékben megemelkedett, továbbá jelentős sejtpusztulás volt megfigyelhető, kapcsolatot teremtve ezáltal a IV-es típusú kollagén génjeit érintő mutációk, valamint az intestinális diszfunkció és az AMP túlexpresszió között, jelezve a COL4A1 fehérje immunfolyamatokra kifejtett közvetett hatását.

A mátrix–integrin–intracelluláris struktúrfehérje vonal bármely eleme, vagy azok fiziológiás működésében szerepet játszó protein hibás működése a mutánsainkban megfigyelhetőhöz hasonló tünetek megjelenéséhez vezethet.

Summary

The structure and function of the mucosal epithelia is determined and supported by the underlying basement membrane (BM). The BM functions in separation, epithelial cell polarization, absorption, sensation and secretion in various tissues and body compartments. The BM is a specialized form of the extracellular matrix, composed of numerous components with a predominance of type IV collagens COL4A1 and COL4A2. Mammals, including humans, harbor three pairs of type IV collagen genes (*COL4A1-6*). The inherited disorder of renal, ocular and cochlear basement membranes associates with mutations of the X-linked *COL4A5* gene in the majority of patients with Alport syndrome, whereas lesions in the autosomal *COL4A3* and *COL4A4* genes are responsible for the symptoms of Alport syndrome in about 20% of patients. The majority of the mammalian BM is composed of building units of type IV collagen trimers with (COL4A1)₂COL4A2 composition. Clinical manifestations associated with *COL4A1* mutations include perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly, hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps (HANAC), ocular dysgenesis, myopathy and Walker-Warburg syndrome. The latest reports demonstrate systemic tissue degeneration and pleiotropy associated with *COL4A1* mutations and confirm the experimental observations that the phenotypes of *COL4A2* mutations are phenocopies of *COL4A1* gene mutations.

The mucosal epithelia of the gastrointestinal tract are constantly challenged by the microbiome resulting in various types of interactions including commensalism, symbiosis and pathogenicity. Host-microbe interactions in the gut are studied only in a few animal models including *Drosophila melanogaster*. Antimicrobial defense in *Drosophila* is facilitated by phagocytosis of pathogenic microorganisms, by the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs) and by the generation of reactive oxygen species. Gut-associated bacterial community in *Drosophila* is scarce, harboring 1-20 bacterial phylotypes. Recent studies identified five dominating commensal species in the gut of wild-type flies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter morbifer* and

Commensalibacter intestini. Overexpression of AMPs, demonstrated in *caudal* hypomorphic RNAi mutants, resulted in restructuring of the commensal bacterial population with the dominance of the pathogenic *Gluconobacter morbifer* accompanied by degradation of gut epithelial cells and high mortality of the host. These observations suggested a potential role for high levels of AMPs in epithelial cell degeneration, gut pathogenesis, and increased mortality. In aging flies, dysfunction of the intestinal barrier that normally permits the absorption of nutrients and solutes and hampers host contact with harmful entities including microorganisms has been, accordingly, tightly linked to overexpression of AMPs. Compromised intestinal barrier function was also noted in *big bang* (*bbg*) null *Drosophila* mutants. The BBG protein is localized in the gut epithelial septate junctions that, in the absence of BBG, are compromised and result in reduced lifespan and chronic inflammation of the anterior midgut epithelium in mutant animals.

We have recently reported an allelic series of conditional, dominant, temperature-sensitive (DTS) mutations in the type IV collagen gene *col4a1* in *Drosophila*. The *col4a1* mutant heterozygotes are viable and fertile at permissive temperature (20°C), but perish at restrictive temperature (29°C). The phenotype associated with mutations of *col4a1* include severe myopathy resulting from massive degradation of striated muscle fibers and degeneration of both the circular smooth muscle cells and epithelial cells of the gut that occurs following detachment from the BM. While there are signs of some repair, the capacity of the scavenger system, and/or the kinetics of cell renewal and regeneration fail to keep up with the ongoing cell degeneration in these mutants. Based on these observations, we hypothesized that *col4a1* mutants may suffer from extensive cell damage-induced chronic inflammation and demonstrate a robust immune response. In *Drosophila*, during inflammation the immune response involves the immediate synthesis of AMPs. Therefore, we have carried out a series of tests in order to determine whether AMP induction is associated with mutation-induced aberrant *col4a1* functions in *DTS-L3* mutants selected for analysis based on the presence of confirmed cell degeneration and its lowest survival rate among the *col4a1* mutant lines at 29°C.

After identifying the mutation sites in the *col4a1* gene in each of our alleles we focused on the *DTS-L3* mutant. We have noticed a TUNEL positive reaction in the intestinal tract of these animals at restrictive temperatures.

Our results demonstrated overexpression of the AMP genes *Metchnikowin*, *Diptericin*, *Diptericin B*, *Attacin A*, *Attacin C* and *edin*, compared to their down-regulation in control

animals. These experiments were fortified by the *in vivo* expression of GFP-tagged ATT proteins in the intestines in accordance with the expression pattern demonstrated at the mRNA level. Phylogenetic analysis of the gut bacteria identified in both mutant and control animals, *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter cerevisiae* as cultivable members of the intestinal microbial community with decreased CFU values under restrictive conditions. Antibiotic treatment resulted in lengthened maximal life spans, but similar half-lives.

High dose diet of either *Lactobacillus plantarum* or *Acetobacter cerevisiae* was detrimental at high temperatures, but can be tolerated at 20°C. The same bacilli were less harmful when applied at lower CFUs.

Data from this study support the conclusion that in *col4a1* mutant *Drosophila* compromised BM function, gut epithelial cell detachment cause enlarged mid-gut with multiple diverticula, extensive cell degeneration, overexpression of AMP genes, collectively leading to intestinal dysfunction and shortened life span.

Irodalomjegyzék

- Alamowitch, S., Plaisier, E., Favrole, P., Prost, C., Chen, Z., Agtmael, T., Marro, B., Ronco, P., 2009. Cerebrovascular disease related to COL4A1 mutations in HANAC syndrome. *Neurology* 73, 1873–82.
- Anker, M.C., Arnemann, J., Neumann, K., Ahrens, P., Schmidt, H., König, R., 2003. Alport syndrome with diffuse leiomyomatosis. *Am. J. Med. Genet. A* 119A, 381–385.
- Aszódi, A., Pfeifer, A., Wendel, M., Hiripi, L. & Fässler, R., 1998. Mouse models for extracellular matrix diseases. *J Mol Med.* 76, 238–252.
- Ayres, J., Freitag, N., Schneider, D., 2008. Identification of *Drosophila* Mutants Altering Defense of and Endurance to *Listeria monocytogenes* Infection. *Genetics* 178, 1807–1815.
- Bai, X., Dilworth, D., Weng, Y.-C., Gould, D., 2009. Developmental distribution of collagen IV isoforms and relevance to ocular diseases. *Matrix biol.* 28, 194–201.
- Barry, M., Triplett, A., Christensen, A., 1999. A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol.* 29, 319–327.
- Behr, M., Hoch, M., 2005. Identification of the novel evolutionary conserved obstructor multigene family in invertebrates. *FEBS Lett.* 579, 6827–6833.
- Bhave, G., Cummings, C., Vanacore, R., Kumagai-Cresse, C., Ero-Tolliver, I., Rafi, M., Kang, J.-S., Pedchenko, V., Fessler, L., Fessler, J., Hudson, B., 2012. Peroxidasin forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol.* 8, 784–790.
- Bonnay, F., Cohen-Berros, E., Hoffmann, M., Kim, S., Boulianne, G., Hoffmann, J., Matt, N., Reichhart, J.-M., 2013. big bang gene modulates gut immune tolerance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 2957–2962.

- Borza, D.B., Bondar, O., Ninomiya, Y., Sado, Y., Naito, I., Todd, P., Hudson, B.G., 2001. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 28532–40.
- Bosman, F., Stamenkovic, I., 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200, 423–428.
- Bouaouina, M., Jani, K., Long, J.Y., Czerniecki, S., Morse, E.M., Ellis, S.J., Tanentzapf, G., Schöck, F., Calderwood, D.A., 2012. Zasp regulates integrin activation. *J. Cell. Sci.* 125, 5647–57.
- Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E., Hudson, B.G., 2000. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.* 275, 30716–24.
- Boute, N., Exposito, J., Boury- Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K., Garrone, R., 1996. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol Cell.* 88, 37–44.
- Boutros, M., Agaisse, H., Perrimon, N., 2002. Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Dev Cell.* 3, 711–22.
- Broderick, N., Buchon, N., Lemaitre, B., 2014. Microbiota-Induced Changes in *Drosophila melanogaster* Host Gene Expression and Gut Morphology. *MBio* 5, e01117–14.
- Broderick, N., Lemaitre, B., 2012. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes* 3, 307–321.
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., Skaer, H., 2010. Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 19, 296–306.
- Chung, A., Jaffe, R., Freeman, I., Vergnes, J.-P., Braginski, J., Carlin, B., 1979. Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* 16, 277–287.
- Cochat, P., Guibaud, P., Garcia Torres, R., Roussel, B., Guarner, V., Larbre, F., 1988. Diffuse leiomyomatosis in Alport syndrome. *J. Pediatr.* 113, 339–43.

- Cornman, R.S., Willis, J.H., 2009. Annotation and analysis of low-complexity protein families of *Anopheles gambiae* that are associated with cuticle. *Insect Mol. Biol.* 18, 607–22.
- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., Bourtzis, K., Mandrioli, M., Cherif, A., Bandi, C., Daffonchio, D., 2010. Acetic Acid Bacteria, Newly Emerging Symbionts of Insects. *Appl Environ Microbiol.* 76, 6963–6970.
- Dagenais, M., Douglas, T., Saleh, M., 2014. Role of programmed necrosis and cell death in intestinal inflammation. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30, 566–75.
- Dalgleish, R., 1998. The Human Collagen Mutation Database 1998. *Nucleic Acids Res.* 26, 253–5.
- Ellis, L., Carney, G., 2011. Socially-Responsive Gene Expression in Male *Drosophila melanogaster* Is Influenced by the Sex of the Interacting Partner. *Genetics* 187, 157–169.
- Erickson, A.C., Couchman, J.R., 2000. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1291–306.
- Faust, J., Verma, A., Peng, C., McNew, J., 2012. An Inventory of Peroxisomal Proteins and Pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic* 13, 1378–1392.
- Gordon, M.K., Hahn, R.A., 2010. Collagens. *Cell Tissue Res.* 339, 247–57.
- Gould, D., Phalan, F., Breedveld, G., Mil, S., Smith, R., Schimenti, J., Aguglia, U., Knaap, M., Heutink, P., John, S., 2005. Mutations in Col4a1 Cause Perinatal Cerebral Hemorrhage and Porencephaly. *Science* 308, 1167–1171.
- Guo, X., Johnson, J., Kramer, J., 1991. Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 349, 707–709.
- Gupta, M., Graham, P., Kramer, J., 1997. Characterization of $\alpha 1(\text{IV})$ Collagen Mutations in *Caenorhabditis elegans* and the Effects of $\alpha 1$ and $\alpha 2(\text{IV})$ Mutations on Type IV Collagen Distribution. *J Cell Biol.* 137, 1185–1196.
- Ha, E.-M.M., Oh, C.-T.T., Bae, Y.S., Lee, W.-J.J., 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847–50.
- Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Czaja, K., Sebastian, K., Kurschat, P., Gan, L., Denecke, B., Ekanayake-Bohlig, S., Wilhelm, K.-P., Merk, H.F., Baron, J.M., 2012. Dexpanthenol Modulates Gene Expression in Skin Wound Healing in vivo. *Skin Pharmacol Physiol.* 25, 241–248.

- Hooper, L., Gordon, J., 2001. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* 292, 1115-1118.
- Hudson, B., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., Neilson, E., 2003. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *N Engl J Med.* 348, 2543-56.
- Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195–9.
- Hwang, E., Brodsky, B., 2012. Folding Delay and Structural Perturbations Caused by Type IV Collagen Natural Interruptions and Nearby Gly Missense Mutations. *J Biol Chem.* 287, 4368–4375.
- Hwang, E., Thiagarajan, G., Parmar, A., Brodsky, B., 2010. Interruptions in the collagen repeating tripeptide pattern can promote supramolecular association. *Protein Science* 19, 1053–1064.
- Hynes, R.O., 2012. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 196, 671-679
- Hynes, R.O., 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216–9.
- Ibrahim, D., Biehs, B., Kornberg, T., Klebes, A., 2013. Microarray Comparison of Anterior and Posterior Drosophila Wing Imaginal Disc Cells Identifies Novel Wing Genes. *G3 (Bethesda)* 3, 1353–1362.
- Inlow, J., Restifo, L., 2004. Molecular and Comparative Genetics of Mental Retardation. *Genetics* 166, 835–881.
- Jacobs, K., Meire, F.M., 2000. Lenticonus. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 65–70.
- Jones, J., Robertson, D., Boot-Handford, R., 2007. On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol.* 26, 2-11.
- Jones, R.T., Sanchez, L.G., Fierer, N., 2013. A cross-taxon analysis of insect-associated bacterial diversity. *PLoS ONE* 8, e61218. 1-10.
- Junion, G., Bataille, L., Jagla, T., Ponte, J., Tapin, R., Jagla, K., 2007. Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors. *Genes Dev.* 21, 3163–3180.
- Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T., Penttinen, R., 2009. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 61, 198–223.

- Kadler, K., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R., 2007. Collagens at a glance. *J Cell Sci.* 120, 1955–1958.
- Kalajdzic, P., Oehler, S., Reczko, M., Pavlidi, N., Vontas, J., Hatzigeorgiou, A., Savakis, C., 2012. Use of Mutagenesis, Genetic Mapping and Next Generation Transcriptomics to Investigate Insecticide Resistance Mechanisms. *PLoS ONE* 7, e40296. 1-14.
- Kashtan, C.E., 2000. Alport syndromes: phenotypic heterogeneity of progressive hereditary nephritis. *Pediatr. Nephrol.* 14, 502–12.
- Keene, D., Sakai, L., Lunstrum, G., Morris, N., Burgeson, R., 1987. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 104, 611–621.
- Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiha, J., Kiss, A., Bircher, U., Szidonya, J., Maróy, P., Juhász, G., Komonyi, O., Csiszár, K., Mink, M., 2012. Drosophila basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy. *Matrix Biol.* 31, 29–37.
- Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiszar, K., Mink, M., 2011. Inherited Myopathies, in: *Muscular System - Anatomy, Functions and Injuries*. Nova Publishers Inc., pp. 1–40.
- Kelleher, E., Pennington, J., 2009. Protease Gene Duplication and Proteolytic Activity in *Drosophila* Female Reproductive Tracts. *Mol Biol Evol.* 26, 2125–2134.
- Khoshnoodi, J., Sigmundsson, K., Cartailier, J.-P., Bondar, O., Sundaramoorthy, M., Hudson, B., 2006. Mechanism of Chain Selection in the Assembly of Collagen IV a Prominent Role for the $\alpha 2$ Chain. *J Biol Chem* 281, 6058–6069.
- Kido, A., Monma, C., Togashi, K., Ueda, H., Itoh, K., Fujii, S., Konishi, J., 2003. Uterine arterial embolization for the treatment of diffuse leiomyomatosis. *J Vasc Interv Radiol* 14, 643–7.
- Kim, T., Kwon, Y.-J., Kim, J., Song, Y.-H., Kim, S., Kim, Y.-J., 2004. MED16 and MED23 of Mediator are coactivators of lipopolysaccharide- and heat-shock-induced transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 12153–12158.
- King, V., Tower, J., 1999. Aging-Specific Expression of *Drosophila* hsp22. *Dev Biol.* 207, 107-18.
- Kivirikko, K.I. and Pihlajaniemi, T., 1998, Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 72, 325–398

- Kramer, R., Bella, J., Mayville, P., Brodsky, B., Berman, H., 1999. Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure. *Nat Struct Biol.* 6, 454–457.
- Kubli, E., 2003. Sex-peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cell Mol Life Sci.* 60, 1689–704.
- Kuo, D., Labelle-Dumais, C., Gould, D., 2012. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum Mol Genet.* 21, R97–R110.
- Labelle-Dumais, C., Dilworth, D., Harrington, E., Leau, M., Lyons, D., Kabaeva, Z., Manzini, M., Dobyns, W., Walsh, C., Michele, D., Gould, D., 2011. COL4A1 Mutations Cause Ocular Dysgenesis, Neuronal Localization Defects, and Myopathy in Mice and Walker-Warburg Syndrome in Humans. *PLoS Genet.* 7, e1002062. 1-14.
- Lai, E.C., Bodner, R., Kavalier, J., Freschi, G., Posakony, J.W., 2000. Antagonism of notch signaling activity by members of a novel protein family encoded by the bearded and enhancer of split gene complexes. *Development* 127, 291–306.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2000. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288(5463):146-9.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Immunology* 25, 697–743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14614–9.
- Leys, S., Riesgo, A., 2012. Epithelia, an Evolutionary Novelty of Metazoans. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 318, 438–447.
- Lodish, H, Berk, A, Kaiser, C.A., Krieger, M, Scott, M.P., Bretscher, A, Ploegh, H, Matsudaira, P, 2010. *Molecular cell biology*; W. H. Freeman; 6th edition; ISBN-10: 0716776014
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J Biol Chem.* 193, 265–75.

- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., Andó, I., 2009. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(12):4805-9.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., Ringuette, M., 2008. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J cell sci*. 121, 1671–80.
- Mavrikakis, I., Zeilmaker, C., Wearne, M.J., 2002. Surgical management of anterior lenticonus in Alport's syndrome. *Eye* 16, 798–800.
- McCall, A.S., Cummings, C.F., Bhawe, G., Vanacore, R., Page-McCaw, A., Hudson, B.G., 2014. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* 157, 1380–92.
- McGraw, L., Clark, A., Wolfner, M., 2008. Post-mating Gene Expression Profiles of Female *Drosophila melanogaster* in Response to Time and to Four Male Accessory Gland Proteins. *Genetics* 179, 1395–1408.
- Mellroth, P., Steiner, H., 2006. PGRP-SB1: An N-acetylmuramoyl l-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 350, 994-999.
- Meloni, I., Muscettola, M., Raynaud, M., Longo, I., Bruttini, M., Moizard, M.-P.P., Gomot, M., Chelly, J., Portes, V. des, Fryns, J.-P.P., Ropers, H.-H.H., Magi, B., Bellan, C., Volpi, N., Yntema, H.G., Lewis, S.E., Schaffer, J.E., Renieri, A., 2002. *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 30, 436–40.
- Molnar, J., Fong, K., He, Q., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S., Fogelgren, B., Szauter, K., Mink, M., Csiszar, K., 2003. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1647, 220-224.
- Molnar, J., Ujfaludi, Z., Fong, S., Bollinger, J., Waro, G., Fogelgren, B., Dooley, D., Mink, M., Csiszar, K., 2005. *Drosophila* Lysyl Oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 Are Differentially Expressed and the Active DmLOXL-1 Influences Gene Expression and Development. *J Biol Chem*. 280, 22977–22985.
- Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., Tanguay, R., 2004. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J*. 18, 598-9
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., 2001. Collagens and collagen related

diseases. *Ann. Med.* 33, 7–21

Myllyharju, J., 2003. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* 22, 15–24.

Myllyharju, J., Kivirikko, K., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43.

Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., Nagata, K., 2000. Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol.* 150, 1499–506.

Natzle, J.E., Monson, J.M., McCarthy, B.J., 1982. Cytogenetic location and expression of collagen-like genes in *Drosophila*. *Nature*, 296, 368–71

Obata, F., Kuranaga, E., Tomioka, K., Ming, M., Takeishi, A., Chen, C.-H., Soga, T., Miura, M., 2014. Necrosis-Driven Systemic Immune Response Alters SAM Metabolism through the FOXO-GNMT Axis. *Cell Rep.* 7, 821–33.

Page-McCaw, A., 2008. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 14–23.

Pandey, U., Nichols, C., 2011. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Revi.* 63, 411–436.

Parkin, J., Antonio, J., Pedchenko, V., Hudson, B., Jensen, S., Savage, J., 2011. Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat.* 32, 127–143.

Pastink, A., Heemskerk, E., Nivard, M.J., Vliet, C.J. van, Vogel, E.W., 1991. Mutational specificity of ethyl methanesulfonate in excision-repair-proficient and -deficient strains of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 229, 213–8.

Pauling, L., Corey, R., 1951. The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 37, 272–281.

Peters, B., Shirtliff, M., Jabra-Rizk, M., 2010. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathog.* 6, e1001067. 1–4.

- Plaisier, E., Chen, Z., Gekeler, F., Benhassine, S., Dahan, K., Marro, B., Alamowitch, S., Paques, M., Ronco, P., 2010. Novel COL4A1 mutations associated with HANAC syndrome: A role for the triple helical CB3[IV] domain. *Am J Med Genet A*. 152A, 2550–2555.
- Plaisier, E., Gribouval, O., Alamowitch, S., Mougenot, B., Prost, C., Verpont, M.C., Marro, B., Desmettre, T., Cohen, S.Y., Roullet, E., Dracon, M., Fardeau, M., Agtmael, T. Van, Kerjaschki, D., Antignac, C., Ronco, P., 2007. COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N Engl J Med*. 357, 2687–95.
- Ramachandran, G., Kha, G., 1954. Structure of Collagen. *Nature* 174, 269–270.
- Reiter, L., 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 11, 1114–1125.
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C.L., Ulgherait, M., Hur, J.H., Ansari, W.S., Lo, T., Jones, D.L., Walker, D.W., 2011. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab*. 14, 623–34.
- Rera, M., Clark, R.I., Walker, D.W., 2012. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 21528–33.
- Rexhepaj, A., Liu, H., Peng, J., Choffat, Y., Kubli, E., 2003. The sex-peptide DUP99B is expressed in the male ejaculatory duct and in the cardia of both sexes. *Eur J Biochem*. 270, 4306–4314.
- Ricard-Blum, S., 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3, a004978.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)*. 53, 430–442.
- Roh, S., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Kim, K.-H., Kim, M.-S., Ryu, J.-H., Kim, S.-H., Lee, W.-J., Bae, J.-W., 2008. Phylogenetic Characterization of Two Novel Commensal Bacteria Involved with Innate Immune Homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol*. 74, 6171–6177.
- Rost, S., Bach, E., Neuner, C., Nanda, I., Dysek, S., Bittner, R., Keller, A., Bartsch, O., Mlynski, R., Haaf, T., Müller, C., Kunstmann, E., 2014. Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. *Eur J Hum Genet*. 22, 208–215.

- Ryu, J.-H.H., Kim, S.-H.H., Lee, H.-Y.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.-D.D., Bae, J.-W.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.-M.M., Lee, W.-J.J., 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319, 777–82.
- Sanes, J., 2003. The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 278, 12601–12604.
- Sasaki, T., Fässler, R., Hohenester, E., 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 164. 959-63
- Segal, Y., Zhuang, L., Rondeau, E., Sraer, J.D., Zhou, J., 2001. Regulation of the paired type IV collagen genes COL4A5 and COL4A6. Role of the proximal promoter region. *J Biol Chem.* 276, 11791–7.
- Sibley, M.H., Graham, P.L., Mende, N. von, Kramer, J.M., 1994. Mutations in the alpha 2(IV) basement membrane collagen gene of *Caenorhabditis elegans* produce phenotypes of differing severities. *EMBO J.* 13, 3278–85.
- Srinivasan, M., Uzel, S., Gautieri, A., Keten, S., Buehler, M., 2009. Alport syndrome mutations in type IV tropocollagen alter molecular structure and nanomechanical properties. *J Struct Biol.* 168, 503–10.
- Suzuki, D.T., 1970. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. *Science* 170, 695–706.
- Timpl, R., Brown, J., 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18, 123–132.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R., 1979. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 254, 9933–7.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737–48.
- Valtavaara, M., Szpirer, C., Szpirer, J., Myllylä, R., 1998. Primary structure, tissue distribution, and chromosomal localization of a novel isoform of lysyl hydroxylase (lysyl hydroxylase 3). *J Biol Chem.* 273, 12881–6.

- Vanacore, R., Ham, A.-J., Voehler, M., Sanders, C., Conrads, T., Veenstra, T., Sharpless, K., Dawson, P., Hudson, B., 2009. A sulfilimine bond identified in collagen IV. *Science*, 325, 1230–4.
- Vanha-Aho, LM, Valanne, S, Rämet, M, 2016. Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunol Lett.* 170, 42-51.
- Villegas, E., Gilliland, S., 1998. Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *J Food Sci.* 63, 1070–1074.
- Wang, X., Harris, R., Bayston, L., Ashe, H., 2008. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* 455, 72–77.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., Hultmark, D., 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 13772–13777.
- Wiederholt, T., Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Joussen, S., Erdmann, K., Schröder, H., Merk, H., Baron, J., 2009. Calcium pantothenate modulates gene expression in proliferating human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol.* 18, 969-78.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W., Cramer, G., Kimbrell, D., Dearolf, C., 1997. viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* 198, 17-25.
- Yee, G., Hynes, R., 1993. A novel, tissue-specific integrin subunit, beta nu, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Development* 118, 845–58.
- Yoneda, Y., Haginoya, K., Arai, H., Yamaoka, S., Tsurusaki, Y., Doi, H., Miyake, N., Yokochi, K., Osaka, H., Kato, M., Matsumoto, N., Saitsu, H., 2012. De Novo and Inherited Mutations in COL4A2, Encoding the Type IV Collagen $\alpha 2$ Chain Cause Porencephaly. *Am J Hum Genet.* 90, 86-90
- Zaidman-Rémy, A., Poidevin, M., Hervé, M., Welchman, D., Paredes, J., Fahlander, C., Steiner, H., Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B., 2011. *Drosophila* Immunity: Analysis of PGRP-SB1 Expression, Enzymatic Activity and Function. *PLoS ONE* 6, e17231, 1-11.
- Zwarts, L., Magwire, M., Carbone, M., Versteven, M., Herteleer, L., Anholt, R., Callaerts, P., Mackay, T., 2011. Complex genetic architecture of *Drosophila* aggressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 17070–17075.

Zúñiga, A., Hödar, C., Hanna, P., Ibáñez, F., Moreno, P., Pulgar, R., Pastenes, L., González, M., Cambiazo, V., 2009. Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *BMC Biol.* 7, 61-79.

Függelék

Abszolút pozíció	Leírás	DTS-L2	DTS-L3	DTS-L4	DTS-L5	DTS-L10	a-30	b-9	b-17
5030847	C-A intron3	-	-	-	-	-	he	-	-
5031058	T-C A91	-	he	he	he	HO	HO	HO	HO
5031148	G-A K121	-	-	-	-	-	he	-	-
5031271	C-T I162	-	-	-	-	-	he	-	-
5031277	T-C G164	-	-	-	-	-	he	-	-
5032770	A-T A595	he	he	-	-	-	-	-	-
5033778	T-C D931	he	he	he	he	he	he	he	he
5034560	T-C G1171	he	he	he	he	HO	HO	HO	HO
5034719	C-T I1224	he	he	he	he	HO	HO	HO	HO
5035104	G-A K1325	he	he	he	he	HO	he	HO	HO
5035107	T-C P1326	he	he	he	he	HO	he	HO	HO
5036242	A-G intron8	he	he	he	he	he	he	he	he
5036897	G-A 3'UTR	he	he	he	he	he	he	he	he

V. táblázat Csendes mutációk a vizsgált törzsek *col4a1* génjében; a mutációk nem okoznak aminosav cserét, a leírás oszlopban az As-ak száma csak a könnyebb visszakereshetőség érdekében szerepel; -: konszenzus szekvenciával egyező nukleotid, he: heterozigóta, HO: homozigóta az adott SNP-re nézve

Query	80	CVPKCIAEKGNRGLPGPLGPTGLKGEMGFPGMEGPSGDKGQKGDPGPYGQRGDKGERGSP	139
		+ C KG G PGP+G GL+G G G G +G G+KGD G YG++G+KG RG	
Sbjct	36	TLCDCKGIKGRMGAPGPIGVPGLEGPAIDIGPPGRAGPLGEKGDVGEYGEQGEKGHRGDI	95
Query	140	GLHGQAGVPGVQGPAGNPGAPGINGKDGCDGQDGIPGLEGLSGMPGPRGYAGQLGSKGEK	199
		G G+ G PG+ G +G PG PG G DGCDG+ PG++G SG PG G G G G++	
Sbjct	96	GPKGEMGYPGIMGKSGEPGTPGPRGIDGCDGR---PGMQGPSGAPGQNGVRGPPGKPGQQ	152
Query	200	GEPAKENG---YAKGEKGEPEGWRGTAGLAGPQGFPEKGERGDSGPYGAKEGPRGEHGL--	255
		G P + +KG KG G G G GP GF G++G +GD+G G G +G+ GL	
Sbjct	153	GPPGEAGEGGINSKGTGKNRGETGQPGGVGPPGFDGDRGSKGDTGYAGLTGEKGDPLPG	212
Query	256	-KGEKGASCYGPMK-PGAPGIKGEKGEPASSFVKPTHTVMGPRGDMGQKGEPLVGRKG	313
		KG+ GA P G PG KGE G+ S +KP T+ G +G +G +G+ G G G	
Sbjct	213	PKGDTGAVSELPYSLIGPPGAKGEPGDSLSGV-LKPDDTLKGYKGYVGLQGDEGPQGPTG	271
Query	314	EPGPEGDTGLDGQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGSTGQKGDREPLNGLPGNPGQKG	373
		E G G GL G +GE GPG+RG+ G G PG G KG +G PG G G G G	
Sbjct	272	EQGAVGRNGLPGARGEI---GGPGERGKPGKDGEPRFGDKGMKGAPGWTGADGLDGSPG	328
Query	374	EPGRAGATGKPGLLGPPGPPGGG--RGTPGPPGPKGPRGYVGAPGPQGLNGVDGLPGPQG	431
		E G G TG PG+ G GPPG T PGP G +G +G PG QG G+ G PG +G	
Sbjct	329	ERGEDGFTGMPGVQGGAGPPGIYDPSLTKSLPGPIGSQGDIGPPGEQGPPLPGKPGRRG	388

Query	432	YNGQKGGAGLPGRPGNEGPPGKKGEKGTAGLNGPKGSIGPIGHPGPPGPEGQKGDAGLPG	491
		G G +G PG G+ GPPG+ E+G AG G G GP G PG G G+ G G PG	
Sbjct	389	PIGLAQSGDPGLNGSRGPPGRS-ERGEAGDYGFIPPGPQGPPEAGLPGRYGLHGEPG	447
Query	492	YGIQGSKGDAGIPGYPLKGSKGER---GFKGNAGAPGD--SKLGRPGTPGAAGAPGQKG	546
		+ G KG+ G+ G PGL+G +G+R G G+ G PG+ + +G PG+ G G G G	
Sbjct	448	QNVVGPKEPGLNGQPGLGEGYRGDRGEVGLPGDKGLPGEGYNIVGPPGSQGPFGRLPG	507
Query	547	DAGRPGTPGQKGMGIKGDVGGKCSSCRAGPKGDKGTSGLPGIPGKDGARGPPGERGYPG	606
		D G G G G+ G++GD C C AGP+G +G G G PG G R G G G	
Sbjct	508	DDGYNLRGLPGKEKGLRGD---DCPVCNAGPRGPRGQEGDTGYPGSHGNR---GAIGLTG	561
Query	607	ERGHGTINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGKP-----ALCDLSLIEPLKGDKGYPGA	661
		RG G+ G G G KG G G+PG G+ G A+ SL + GD G G	
Sbjct	562	PRGVQGLQGNPGRAGHKGLPGPAGIPGEPGKVGAAAGPDGKAIEVGSRLKGEIGDTGDSGH	621
Query	662	PGAKGVQGFKAEGPLGIPGPKGEFGFKGEKGLSGAPGNDGTPGRAGRDGYPG----IPG	717
		G G G KG +G G G +GE G +G+ G +G G DG PGR GRDG PG P	
Sbjct	622	RGDTGDDGEKGRDGSDSKGERGETGQRGDYGDAGYQGRDGEPRDGRDGAPGRNATTPK	681
Query	718	QSIKGEPGFHRDGAKGDKGSFGRSKEGEPGSCALDEIKMPAKGNKGEPGQTGMPPPG	777
		+ GEPG+ G G +GD G G G KGEP + + N GEPG+ G GP G	
Sbjct	682	VYLIGEPGYDGIKGERGDDGDTGFKGVKGEPNPGQIYD-----NTGEPGEDGYTGPKG	734
Query	778	EDGSPGERGYTGLKGNTGPQGP-----PGVEGPRGLNGPRGEKGNQGA VGVPGNPGKDGL	832
		G+ GE+G GL+G G +GP PG G +G GP G+ G QGA G+PG G+ GL	
Sbjct	735	VKGAKEQGAIGLRGEIGDRGPAGEVIPGPVGA GYPGPTGDYQQA GGLPGRDGEPL	794
Query	833	RGIPGRNGQPGPRGEPGISRPGPMGPPGLNGLQGEKGDRTGPIGFPGADGSVGYPGDR	892
		G G GQ G G+ I G +GPPG +G++G GD G G G G G G++	
Sbjct	795	DGGIGYKQGRGVPQGEVIQ--GEIGPPGRSGIKGFPGDVGA PGQYGLAGRP GPKGVKGEQ	852
Query	893	GDAGLPVSGRPGIVGEKGDVGPPIGPAGVAGPPGVPIDGVRGRDGAKEGPGSPGLVGMP	952
		G G G +G PG G++GD +GP G G PG G G G KGE GS G G	
Sbjct	853	GPDGAVGQTGLPGNKGQRGDF-LVGPPGPKGQPGRNQRQAPHGAKGQKGEVGS LGQNGQN	911
Query	953	GNKGDGRGAPGNDGPKGFAGVTGAPGKRGPAGIPGVSGAKGDKGATGLTGNDGPVGGRGPP	1012
		G KG G G G G AG+ G PG G G+PG+ G G++G G G G +G RGP	
Sbjct	912	GAKGSIGFSGRRGLLGNAQLQGLPGSPGIPGLPGMIGEIGERGEIGYNRQGDIGPRGN	971
Query	1013	GAPGLMGIKGDQGLAGAPGQQGLDGMPEKGNQGFPLDGPPGLPGDASEKGQKGEPPGS	1072
		G G G+ GD G G PG GL G GE GN GFPG PG G A+ G KG+ G S	
Sbjct	972	GEFGPKGLSGDDGPDGYPGANGLPGRKGETGNPGFPGR---PGAKGVAAYSIGKDDGES	1028
Query	1073	GLRGDTGPAGTPGWPGEKGLPG-----LAVHGRAGPPGEKGDQGRSGIDGRDINGEKG	1126
		GL TGP G PG PG KG G A+ G AG GE G G +G+ GR G+ G++G	
Sbjct	1029	GL---TGPIGYPGAPGAKGQRGPVGDSPALDGVAGRKGEVGSPPGNLPGRHGLKGQRG	1085
Query	1127	EQGLQGVWGPGEKGSVGA PGIPGAPGMDGLPGAAGAPGAVGYPGDRGDKGEPGLSGLPG	1186
		++GL G G+PGE G+ G G PG G++GL GA G PG G G +G+ G GL G G	
Sbjct	1086	DRGLPGQQGRPGEPGAKGLGGYPGRNGINGLKGATGFPGPQGPKGPGQGESGVVGLDGRNG	1145

Query	1187	LKGETGPVGLQGFTGAPGPKGERGIRGQPLPATVPDIRGDKGSQGERGYTGEKGEQGER	1246
		G+ GP GL G G G +G+ G G PG + D +G G++G GE+GEQG+	
Sbjct	1146	QIGDQGPRLIGEQQEQGEQGEVGIPIGRLENLRDRSFYRGFTGDQGLQGERGEQGD	1205
Query	1247	---GLTGPAVAGAKGDRGLQPPGASGLNGIPGAKGDIGPRGEIGYPGVTIKGEKGLPG	1303
		G GP G G +GD G G G G G+ G +GD GPRG PG+T+ EKG G	
Sbjct	1206	GPIGFIGPPGAKGERGDIGYAGQLGFDGAEGLKGFQGDQGPGRP---PGITLPAEKGDEG	1262
Query	1304	RPGRNQRQGLIGAPGLIGERGLPGLAGEPGLVGLPGPIGP--AGSKGERGLAGSPGQPGQ	1361
		G +GR G PG G++G PG GE G G G GP G G +G G PG PG	
Sbjct	1263	VAGLDGR---AGRPGHFGQKGAPPPGENGPNGAIGHRGPIQGPQGDVGFPGAPGH	1319
Query	1362	DGFPGAPGLKGDTPQGFKGERGLNGFE--GQKGDKGDRGLQGPSGLPGLVGQKGDTP	1419
		+G G G KG+ G G +GERG +G+ G++GD GD G QG PG G KG+ GYP	
Sbjct	1320	NGRHGLIGPKGELGDMGRQGERGESGYAIVGRQGDIGDIGFQGE---PGWDGAKGEQGY	1376
Query	1420	GLNGNDGPVGPAPGERGFTGPKGRDGRDGTPLPGQKGEPM-----LPPPGPKGEPGQPG	1474
		GL G +G VGAPG RG TG G G DG GL G KG+PG+ + PG +GEPG G	
Sbjct	1377	GLPGKNGRVGAPGPRGPTGDAGWGGIDGMDGLVGPKGQPGVTYSYSMARPGDRGEPGLDG	1436
Query	1475	RNGPKGEPGRPGERGLIGIQGERGEKGERGLIGETGNVGRPGPKGDRGEPGERGYEGAIG	1534
		G +G+ G P GLIG QG+RG G RG GE G G GP+G RG+ G G GA G	
Sbjct	1437	FQGEEDGGAP---GLIGFQGRGAVGYRGDQGEVGYTGADGPQGRGDKGYMGLTGAPG	1493
Query	1535	LIGQKGEPPAPAPAALDYLT-GILITRHSQSETVPACSAGHTELWTGYSLLYVDGNDYAH	1593
		L G G G PAPA + G + RHSQS VP C A LW GYSL A	
Sbjct	1494	LRGLPGPQGEPPAPPAPKSRGFI FARHSQSVHVPQCPANTNLLWEGYSLSGNVAASRAV	1553
Query	1594	NQDLGSPGSCVPRFSTLPVLSCGQNNVCNYASRNDKTFWLTTNAAIP--MMPVENIEIRQ	1651
		QDLG GSC+ RF+T+P + C NVC++A ND + WL+T +P M P++ ++ +	
Sbjct	1554	GQDLGQSGSCMMRFTTMPYMLCDITNVCHFAQNNDLSLWLSTAEPMPMTMTPIQGRDLMK	1613
Query	1652	YISRCVCEAPANVIAVHSQTIEVPDCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGGQALQSPGS	1711
		YISRCVCE +IA+HSQ++ +PDCP GWE +W GYS+ M T GG GQ L SPGS	
Sbjct	1614	YISRCVCETTTRIIALHSQSMSIPDCPGWEEMWTGYSYFMSTLDNVGGVGQNLVSPGS	1673
Query	1652	YISRCVCEAPANVIAVHSQTIEVPDCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGGQALQSPGS	1711
		YISRCVCE +IA+HSQ++ +PDCP GWE +W GYS+ M T GG GQ L SPGS	
Sbjct	1614	YISRCVCETTTRIIALHSQSMSIPDCPGWEEMWTGYSYFMSTLDNVGGVGQNLVSPGS	1673
Query	1712	CLEDFRATPFIECNGAKGTCHFETMTSFWMYNLESSQPFERPQQQTIKAGERQSHVSRC	1771
		CLE+FRA P IEC+G G C++Y+ + SFW+ +E F +P+QQT+KA + S +SRC	
Sbjct	1674	CLEEFRAQPVIECHG-HGRCNYYDALASFWLTVIEEQDQFVQPRQQT LKA-DFTSKISRC	1731
Query	1772	QVCMK 1776	
		VC +	
Sbjct	1732	TVCRR 1736	

15. ábra A *Drosophila melanogaster* COL4A1 (NP_723046.1, felső sor) és VKG (COL4A2, NP_477190, alsó sor) fehérjeszekvenciáinak illesztése

[Drosophila_melanogaster] MLPFWKRLLYAAVIAGAL--VGADAQFWKTAGTAGSIQDSVKHYNRNEPKFPIDDSYDIV 58

[Caenorhabditis_elegans] -----MSRLSLLGLTAAVLLSSFCQDRI----- 24

[Danio_rerio] -----MN--LKSILGAVLLVLTLSAGV----- 20

[Xenopus_tropicalis] -----MRLGSQRMPCLAIVLVVLGHWA----- 23

[Protobothrops_mucrosquamatus] -----MIYGISISVVKLDTCLKDTNIKDECCQWSSSKSQFESWI----- 38

[Gallus_gallus] -----MAEIEI-VEQFM----- 12

[Mus_musculus] -----MQVRGVCLAGWFLALCLWGQP----- 23

[Rattus_norvegicus] -----MQVPGVCLAGWFLALCLWGQP----- 23

[Bos_taurus] -----MKLRGVSLAAGLSLLALSLWGQP----- 23

[Homo_sapiens] -----MKLRGVSLAAGLSLLALSLWGQP----- 23

[Canis_lupus_familiaris] -----MKLRGVSLAAGWFLALSLWGQP----- 23

[Drosophila_melanogaster] DSAGVARGLDLPKNTAGYAGCVPKCIAEKGNRGLPGLPTGLKGMGFFMGEPSPGDK 118

[Caenorhabditis_elegans] -----HVDAAAACCKGCA--PPCVCPGTGKERGNPGFGEPEGHPGAPGQDGPPEGAPAP 75

[Danio_rerio] -----EKSESAAHCGGTGSKCDCSSVKGKDRGLPGLKQGPVPGFPGFPGPMGPR 73

[Xenopus_tropicalis] -----QNAESAAQCQCTSVSKCDCSGVKGKGERGLPGLGHLGLPGFPGFPGPPGPR 76

[Protobothrops_mucrosquamatus] -----G-VVDKACHGCKSTTDCSGHKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPAGSR 90

[Gallus_gallus] -----KVKLARSKDLIVPTGEGERGFPGLGQPLPGFPGFPGPPGPR 56

[Mus_musculus] -----AFAAAHCGSSSGSKCDCSGIKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPPGPR 74

[Rattus_norvegicus] -----GEAAACHGSSSGSKCDCSGIKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPPGPR 74

[Bos_taurus] -----AFAAACYGCSPGSKCDCSGIKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPPGPR 74

[Homo_sapiens] -----AFAAACYGCSPGSKCDCSGIKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPPGPR 74

[Canis_lupus_familiaris] -----AFAAACYGCSPGSKCDCSGIKGKGERGLPGLKQGPVPGFPGFPGPPGPR 74

: * * * * *

[Drosophila_melanogaster] GQKGDGPPGYPGQKGERGSPGLHGQAGVPGVQGPAGNPGAPGINKDGCDGQDIPGLE 178

[Caenorhabditis_elegans] GMFGEAGDFGDMGSKGARGDRGLPGSPGHPLQGLDGLPGLKGEPIPGCNGTDGFPMP 135

[Danio_rerio] GEKGGDPPGQSGIPGKIRGPPGLPGFSGTPIGLPGQDAPGPRGIPGCNGTKGERGFP 133

[Xenopus_tropicalis] GPKGDSGLSGSPGPKIRGPPGPPGFPNGPGLPGHDGEPGAPGIPGCNGTKGDRGFP 136

[Protobothrops_mucrosquamatus] GEKGGDGPFGATGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGQDGPPLGQIPGCNGTKGERGFP 150

[Gallus_gallus] GAKGDDGLPGPIGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGQDGPPLGQIPGCNGTKGERGFP 116

[Mus_musculus] GQKGGDIPGPPGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGHDGAPGPPGIPGCNGTKGERGFP 134

[Rattus_norvegicus] GQKGGDIPGPPGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGHDGAPGPPGIPGCNGTKGERGFP 134

[Bos_taurus] GQKGGDIPGPPGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGHDGAPGPPGIPGCNGTKGERGFP 134

[Homo_sapiens] GQKGGDIPGPPGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGHDGAPGPPGIPGCNGTKGERGFP 134

[Canis_lupus_familiaris] GQKGGDIPGPPGPKIRGPPGLPGFPGTGLPGLPGHDGAPGPPGIPGCNGTKGERGFP 134

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] GLSGMPGPRYAGQLGSKGEGEPAKE--NGDYAKGKGEPEWRGTAGLAGPQGFPGKEG 236

[Caenorhabditis_elegans] GLAGPPGQSGQNGNPGRLSGPPGEGVNSQGRKGVKESGSGVPLPGNSGYPGLKKG 195

[Danio_rerio] GNPGRSGLDQPPGPPGLIGQAKPGEV--IDINRISENGLPFGNFTGRRGDPPGGLQG 191

[Xenopus_tropicalis] GGPFGSGTPGIPGPPGLPGVKGDPGES--F-PLAPGQKGDPLGLPLGPRGTGPIGVQG 193

[Protobothrops_mucrosquamatus] GNSGFFPLGPPGPPGPPGLGKMKGEKDI--ITSPLPGQKGDPPGPPGPGQSGAGPVEG 208

[Gallus_gallus] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGLGKMKGEAGEI--ITSLLPGQKGDQGFPLGPIGPPGSGIPG 174

[Mus_musculus] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGPPGKGEPSI--IMSLPGPKGNQGYPPGPGIQQGPPGPKGISG 192

[Rattus_norvegicus] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGPPGKGEPSI--IMSLPGPKGNQGYPPGPGIQQGPPGPKGVSG 192

[Bos_taurus] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGPPGKGEPSI--IMSLPGPKGNQGYPPGPGIQQGAGPPGPIG 192

[Homo_sapiens] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGPPGKGEPSI--IMSLPGPKGNQGYPPGPGIQQGLPGTIPG 192

[Canis_lupus_familiaris] GSPGFFPLGQPPGPPGPPGPPGKGEPSI--IMSLPGPKGNQGYPPGPGIQQGAPGTGLPG 192

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] ERGDSGYPGAKGPRGEHLKGEKAGSCYGPMPKPGAPGKGEKGEPASSF----- 286

[Caenorhabditis_elegans] AKGDPPGYPGLP---FPVSVGLKGR-----MGVRTSGVKGEKGLPGLPGLGPPGYPWA 247

[Danio_rerio] PIGPPGPKGFEGRPPGPPGPPGPKGN-----MGLNFQGPKEKGEKGLGPPGPPGQVGEV 246

[Xenopus_tropicalis] PVGRPPGALPGSPGVPVPPGPKGN-----MGLNFQGSKGEKGEPIQGLPGLGQLEQ- 247

[Protobothrops_mucrosquamatus] PFGPPGPRGLTGPGLPGLPGLPKGN-----MGVNFQGYKGEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 263

[Gallus_gallus] PVGPPGPPGLTGPGLPGLPGLPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 229

[Mus_musculus] PSGPPGPPGLMGPFPFPFPFPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 247

[Rattus_norvegicus] PSGPPGPPGLMGPFPFPFPFPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 247

[Bos_taurus] PIGPPGPPGLMGPFPFPFPFPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 247

[Homo_sapiens] PIGPPGPPGLMGPFPFPFPFPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 247

[Canis_lupus_familiaris] PIGPPGPPGLMGPFPFPFPFPKGN-----MGLNFQGPKEKGEQGLQGPFPFGQIEQ 247

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] VKP-----THVMGPRGDMGQKGEPLVGRKGEFPGEDTGLD-GQKGEKGLPGGPDGRG 340

[Caenorhabditis_elegans] SKPIEMEVLPQFVPGAGVKGEKGRDGFVGPFGMLGLDGPFGYP-GLKGKGLDGLDAGQRG 306

[Danio_rerio] SGSPDVTIQQGKEDRGIP-----GDTGFPFPFPFPFGQGGQKGEKGEPEAGKRG 297

[Xenopus_tropicalis] VEPPTTIQKGEKIPGDP-----GFPGERGPMGPPGPPGAKGKGEPEEPKIG 298

[Protobothrops_mucrosquamatus] TGNNDIVFQKGDQGVAGDP-----GPPGPPGSPGLPGPSGGGKGEKGEQEPKRG 314

[Gallus_gallus] KRPNDIEFQKGDQVIPGDP-----GPPGLPGQGPPLPGPIKGEKGEQEPKRG 280

[Mus_musculus] KRPIDIEFQKGDQVPGDR-----GPPGPPGIPGPPGPPGKGEKGEPEAGKRG 298

[Rattus_norvegicus] KRPIDIDFQKGDQVPGDR-----GPPGPPGIPGPPGPPGKGEKGEPEEPKRG 298

[Bos_taurus] KRPIDVEFQKGDQGLPGR-----GPPGPPGIRGPPGPPGKGEKGEQEPKRG 298

[Homo_sapiens] KRPIDVEFQKGDQGLPGR-----GPPGPPGIRGPPGPPGKGEKGEQEPKRG 298

[Canis_lupus_familiaris] KRPIDVEFQKGDQGLPGR-----GPPGPPGIRGPPGPPGKGEKGEQEPKRG 298

: * * * * *

[Drosophila_melanogaster]	RQGNFGPPGSTGQKGDGEPLNGLPGNPGQKGEPRAGATGPKGLLPGPPPPGGRGTP	400
[Caenorhabditis_elegans]	KRGKDGVPNGYGEKGSQGEQGLGGTTPGYPTGKGGAGEPGYPPGFECDGCEPLGEGT	366
[Danio_rerio]	KPGKDEPGLLGYPGDKDQGGPGLPRDGFGEKGDQGGPPGPPSYRGDQFT-----GV	351
[Xenopus_tropicalis]	KPGKDKIGLPGGEGFRGDPLPGGPRDGDQKQKGNGLPGPPGEVIRPG-----TG	352
[Protothirops_mucrosquamatus]	KPGKDGDPGLTGLPGSPDPMHGIPIGRDGEKQKGTGLTGPQVIRPPD-----TG	368
[Gallus_gallus]	KPGKDEPGQPRDGLPGGPGVNGVPRDGEKGEKGDVGPFPSPSVITRPG-----ID	334
[Mus_musculus]	KPGKDEGTGPGIPGLPGDPGYPGEPGRDGEKQKGDIGPPGPPGLVIRPAG-----TG	352
[Rattus_norvegicus]	KPGKDEGTGPGIPGLPGDPGYPGEPGRHGEKQKGDIGPPGPPGFVIPTPG-----TG	352
[Bos_taurus]	KPFQDGENGQPGIPGLPGDPGYPGEPGRDGEKQKGDIGLPGPPGLVIRPPG-----TG	352
[Homo_sapiens]	KPGKDENGQPGIPGLPGDPGYPGEPGRDGEKQKGDIGPPGPPGLVIRPPG-----TG	352
[Canis_lupus_familiaris]	KPGKDENGQPGIPGLPGDPGYPGEPGRDGEKQKGDIGSTGPPGLVIRPPG-----TG	352
	: * * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GPPGPKGPRGYVAGPPQGLNGVDLPGPQSYNGQKGGAGLPGRPNEGPPGKKEKGTGA	460
[Caenorhabditis_elegans]	GEAGPHGAQGFDFVQGGKGLPGHDLPGPVGPRGPGVAPGAPGQPGIDMPGYTE-KGDR	425
[Danio_rerio]	GGIGPKGDRG-----DFPGSGIKGDRGLPGIQQPPGPPGPPGIGG-P---	392
[Xenopus_tropicalis]	-RVGPKGNTG-----PPGITGPKGDRGFPGLQGGPPGFPPTGPTSS-V---	392
[Protothirops_mucrosquamatus]	TTVGPKGSKG-----FAGYPSKGDGYPGSPGPPGLPTGPGVAR-V---	409
[Gallus_gallus]	ATVGPKGSKG-----LPGLPAKGERGFSRGRPPGPPGLSPGPTT-V---	375
[Mus_musculus]	VTMGKGNIG-----LPGLPGEKGERGFPGIQGGPPGFPGPPGTAV-V---	393
[Rattus_norvegicus]	VTIGAKGNIG-----QPGLPGEKGERGFPGIQGGPPGFPGPPGTAV-M---	393
[Bos_taurus]	VTVGKGNIG-----LPGLPGDKDGRGFPGIQGGPPGLPGPPGPAV-I---	393
[Homo_sapiens]	ITIGKGNIG-----LPGLPGEKGERGFPGIQGGPPGLPGPPGAIV-M---	393
[Canis_lupus_familiaris]	VTVGKGNMG-----LPGLPGEKGERGFPGIQGGPPGLPGPPGTAV-M---	393
	* : * * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GLNGPKSGISGPIGHPPGPPEQKGDAGLPGYGIQGSKGDAGIP---GYPLGKSGKGERG	517
[Caenorhabditis_elegans]	GEDGYPGFAGEPGLPGEPGDCGYPGEDLPGYDIQGGPGLDQSGRDRGFGIPGIDGDPG	485
[Danio_rerio]	-----GPPGSQLPGERGEKGDGQPGISLPGPPGPPGPTGPGIQQGGPPGPPGF-	442
[Xenopus_tropicalis]	-----PGSGNPLPGERGQKGDGPPGISIPGLPGSEGLAGPPGPPGLPGPPTSA	443
[Protothirops_mucrosquamatus]	-----GPPGPPGLSGERGQKGDQGLPGIAPGQPGIDGQPPRPPGPPGPPGSTI	460
[Gallus_gallus]	-----GPPGPPGLPGERGQKGDPLPGVSIIPGQPGLDGPPGPPGPPGPPAPSV	426
[Mus_musculus]	-----GPPGPPGYPGERGQKGDGPPGICIPGSPGLDQPPGAPGLPFPPPGPPGQL	444
[Rattus_norvegicus]	-----GPPGPPGYPGERGQKGDGPPGICIPGSPGLDQPPGAPGFPFPFPFPGL	444
[Bos_taurus]	-----GPPGPPGFPGERGQKGDGPPGISIPGSPGLDQPPGAPGFPFPFPFPPhi	444
[Homo_sapiens]	-----GPPGPPGFPGERGQKGDGPPGISIPGSPGLDQPPGAPGLPFPFPFPPhi	444
[Canis_lupus_familiaris]	-----GPPGPPGFPGERGQKGDGPPGISIPGFPGLDQPPGAPGLPFPFPFPPhi	444
	* * * * * : * * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	FKGNAGAPGDSKLRPGTPGAAGAPGQKGDAGRPTPGQKGMGIKGDVGGKCSSCR---	574
[Caenorhabditis_elegans]	YSGEKGFPGT-GVNVGPPGMTGLPGEPMGRIGVDGYPPGPNNGERGEDCGYCP-DG	543
[Danio_rerio]	-----NSD-VECNRLPGPPG-----LQGERGFTGDSGQKQKGETCVNCFNSG	485
[Xenopus_tropicalis]	-----VGPA-MVCPGLPGTQG-----LPDPLGFLGERGQKGDGDTFCNCING	487
[Protothirops_mucrosquamatus]	-----PPAG-LICERLPGPEG-----TRGDQGFPPGERGQKGDGDTFCNCISG	504
[Gallus_gallus]	-----PPGE-GLCERLPGPPG-----IPGQGFAGERGQKGDGDTFCNCITG	470
[Mus_musculus]	-----PSRD-EICKAGPPGPPG-----PPGDKGLQGERGVKGDGDTFCNCITG	488
[Rattus_norvegicus]	-----PPSD-EICKAGPPGPPG-----SPGDQGLQGEQGVKGDGDTFCNCITG	488
[Bos_taurus]	-----PPSD-KICERLPGPPG-----SPGDRGLQGEQGVKGDGDTFCNCITG	488
[Homo_sapiens]	-----PPSD-EICEPPGPPG-----SPGDKGLQGEQGVKGDGDTFCNCITG	488
[Canis_lupus_familiaris]	-----SPSD-EICETGPPGPPG-----SPGDRGLQGEQGVKGDGDTFCNCITG	488
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	-AGPKGDKTSGLPPIPKDAGRPPGERGYPGERGHGDIINGQITGPPGEKGEDRTGLPG	633
[Caenorhabditis_elegans]	VPGNAGDPGFFPMNYPGPPGNGDHGDCMPGAPGKPSAGSDGLSGSPGLPIPGYPG	603
[Danio_rerio]	NPV-PGPQGFPPGPPSPGAPGASGSKDRGYPGPGF-----LMGPPGIPGPPGSPGLPG	538
[Xenopus_tropicalis]	ILGPKGDPGLPGFPSPGSPGAPGQKAGMIPGTING-----LPGPPGPPGPPGPPGPPG	541
[Protothirops_mucrosquamatus]	IPGPPGQKGFPLPGDPSPGLPGSKDKGVSVIG-----FIGPQGGPPGQGLSRPG	558
[Gallus_gallus]	ISGPPGERGPPGPPSPGSPGPPGPKGEKGLPLGTG-----LVGPPGPPGPPGAPGPPG	524
[Mus_musculus]	ISGPPGQPLGLPGPPGSLGIPGEKDKQAGITG-----PKGLPGIPGPPGAPGPPG	542
[Rattus_norvegicus]	ISGPPGQPLGLPGPPGSLGIPGEKGEKQAGITG-----PKGLPGIPGPPGAPGPPG	542
[Bos_taurus]	VSGPPGQPLGLPGPPGSLGFPQKGEKGHAGATG-----PKGLSGIPGAPGAPGPPG	542
[Homo_sapiens]	ISGPPGQPLGLPGPPGSLGFPQKGEKQAGATG-----PKGLPGIPGAPGAPGPPG	542
[Canis_lupus_familiaris]	VSGPPGQPLGLPGPPGSLGFPQKGEKGHAGITG-----PKGLTIPGAPGPPGPPG	542
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	ATGEPKAPAL-----CDLSLIEPLKDKGYPGAPGAKGVQGFKAEGELPGIPGPKGEFGF	688
[Caenorhabditis_elegans]	MKGEAGEIVGPMENPAGIPGLKDHGLPLGPRPGSDGLPGYPPGPPGPPGPPGPPG	663
[Danio_rerio]	EKGDPGDTLS-----VLGKDKGDTGFPSPGLPGLGDRGPRDGPVPPGLRGGP-P	590
[Xenopus_tropicalis]	PKGEPPGEGV-----EIKGEKDPGFPSPGAPSPGLDGVPRDGTGPIGPKGPPG	592
[Protothirops_mucrosquamatus]	AKGDPGDMIG-----FPGMKGEKNSGFPGPPGLPLDGSPPGKDIRGYPSGKPPGS	611
[Gallus_gallus]	PKGDPGDLA-----SPRMKDKGDPGFPPPGLPGIDTIPGRDGLPLGPKGPPG	577
[Mus_musculus]	SKGDPGDLT-----LPGMKDKGELGSPGAPGLPLGSPGKDLPLGLPGLGPPG	595
[Rattus_norvegicus]	SKGDPGDLT-----LPGMKGEKELGSPGAPGLPLGSPGKDLPLGLPGLGPPG	595
[Bos_taurus]	PKGPPGDLT-----FPGMKDKGDLGSPGAPGLPLPGTIPGQDLPLGLPGLGPPG	595
[Homo_sapiens]	SKGPPGDLT-----FPGMKDKGELGSPGAPGLPLPGTIPGQDLPLGLPGLGPPG	595
[Canis_lupus_familiaris]	SKGPPGDLT-----FPGMKDKGELGSPGAPGLPLPGTIPGQDLPLGLPGLGPPG	595
	* : * * * * *	

[Drosophila_melanogaster]	KGEKGLSGAPGNDGTPGRAGRDGYPGIPGQSIKGEFGHGRDGAKGDKSGFGRSGEKGE	748
[Caenorhabditis_elegans]	AGIDGKRGRQGSGLGIPGLQGPPGD---SFPQPGTTPGYKGERGADGLPLGPAQGGPRGIP	750
[Danio_rerio]	LGLKGTQGGNKEPGLPGPPGDRGLPGSPGFPGQPSGEKGIQGVSGRPGAPGLPGKGE	760
[Xenopus_tropicalis]	FALKGRGFFGPDIGFPGHGRGLMPPGFGSPGPEKGIQGVSGRPGAPGIPGPKGSP	762
[Protobothrops_mucrosquamatus]	IAFKGRGRTGDSGLPLGSGERGPPGPPGFGPQGGDKGLQGVPRGSPGAPGPKGE	761
[Gallus_gallus]	VAFKGEIGIPDGPAGPLPGDKGLPFPFGFPQGSPEKGIQGVSGRPGPPGVPFGPKGD	763
[Mus_musculus]	ITFKGERGPPGSPGLPLPGNMGTGPFVGFPGPPGPIEKGIQGVAGNPGQPLPGPKGD	765
[Rattus_norvegicus]	ITFKGERGPPGNPLPLPGNMGTGPFVGFPGPPGPIEKGIQGVAGNPGQPLPGPKGD	765
[Bos_taurus]	MAFKGERGPPGNPLPLPGNRGPMGPFVGFPGPPGPIEKGIQGVAGNPGQPLPGPKGD	765
[Homo_sapiens]	ITFKGERGPPGNPLPLPGNIGPMGPPGFGPPGPIEKGIQGVAGNPGQPLPGPKGD	765
[Canis_lupus_familiaris]	IAFKGERGPPGNPLPLPGNRGPMGPFVGFPGPPGPIEKGIQGVAGNPGQPLPGPKGD	765
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GSCALDEIKMPAKGNKGEPPQITG---MPGPPGEDGSPGERGYTGLKNTGPQPPGVEGP	805
[Caenorhabditis_elegans]	APLRIVNQVAGQPGVDMPGLPGDRGADGLPLPGVPGPDGYPGTTPGERGMDGLPGFPGL	780
[Danio_rerio]	G-----MTVPEVGERGPPGQDGDGSGQRPDSSGPPGQPGFPLPGSKGEPGLPGI-GL	703
[Xenopus_tropicalis]	G-----QTVMKEKDFGPPGLPGIPGDAITPGEPGLPGQPGIPGVPGSKGEPGIPGI-GL	705
[Protobothrops_mucrosquamatus]	A-----QSIPEKGGPPGPPGRNGDGFPGDSGQPSGLPGIPGQKGEFGPI-GL	724
[Gallus_gallus]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	690
[Mus_musculus]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	708
[Rattus_norvegicus]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	708
[Bos_taurus]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	708
[Homo_sapiens]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	708
[Canis_lupus_familiaris]	G-----QITTEGVGPPGPPGRNGDGLPGDPPGQPGQGLSLGIPGAKGEPGIPGI-GL	708
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	RGLNGPRGEKGNQGAAGVPGNPGKDLRGIPIGRNGQPGPRGEPGISRPGPMGPPGLNGLQ	865
[Caenorhabditis_elegans]	HGEPMRGGQGEVFNIGDGCCEPGLDGYPGAPGAPGAGETGFGFPQGVYPPGNGDA	840
[Danio_rerio]	PGPPGAKGFPPIAGSGPPGPIPRGLDGLPGQPLPGSKGDPGYPGLPGPPGPTGSPGIK	763
[Xenopus_tropicalis]	PGSAGAKGFPNTGPPGAPGLAGRPGSDGSPGQPLPGPKGDGFLPLPGSPGAPGLK	765
[Protobothrops_mucrosquamatus]	PGPPGPKGFPVSGEPGLPGNSGRPGADGTPLPGAKGQKGERGFGVPPTGPPGPPGFK	784
[Gallus_gallus]	PGPPGPKGFPPTGPPGAPGTIPRGLDGPFGPPGPPGQKDRGFGVPFPFPFPPIK	750
[Mus_musculus]	PGPPGPKGFPPIPGPPGAPGAPRMDGPPGPPGPPGPKGEPGLPGPPGPPGPPGFK	768
[Rattus_norvegicus]	PGPPGPKGFPPIPGPPGAPGAPRMDGPPGPPGPPGPKGEPGLPGPPGPPGPPGFK	768
[Bos_taurus]	PGPPGPKGFPPIPGPPGAPGAPRMDGPPGPPGPPGPKGEPGLPGPPGPPGPPGFK	768
[Homo_sapiens]	PGPPGPKGFPPIPGPPGAPGTIPRIGLEGGPPGPPGPPGPKGEPGFPALPGPPGPPGPFK	768
[Canis_lupus_familiaris]	PGPPGPKGFPPIPGPPGAPGTIPRIGLEGGPPGPPGPPGPKGEPGLPGPPGPPGPPGFK	768
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GEKGRGRTGPIGFPAGDGS---VGYP-----GDRGDAGLPVSGRPGIVGEKGDVGP	916
[Caenorhabditis_elegans]	GAAGLPGP---DGYPRDGLPGTTPGYPEAGMNGQDAGPQPSRGEGLVIGIDG-K-K	894
[Danio_rerio]	GGPGPKGD---SGFPSPGQPGPRGLDAGPAGPKDAGFPGGPPGPPGAPAFGL-QGPP	819
[Xenopus_tropicalis]	GSQGPKE---SGFPSPGLPGRAGFDGFPVPGKDSGQNLPGTTPGPPGVPAGG-QGPP	821
[Protobothrops_mucrosquamatus]	GAQGAKEV---PGFSGNPGSPGQPGFDGAVGAKGDTGPRGQPLVGPPIPGAGG-QGPP	840
[Gallus_gallus]	GVQGPKE---PGFPGNPLPGRAGFDGTPGPKDGPSPGPPGLPGPPGIPGIG-QGPP	806
[Mus_musculus]	GTGPKGD---RGFPSPGPPRTGLDGLPGPKGDVGPNGQPGFVGPGLPGIGL-QGPP	824
[Rattus_norvegicus]	GTGPKGD---RGLPGPPGPPGHTGLDGLPGPKGDAGPNQPGPIGPPGLPGIGL-QGPP	824
[Bos_taurus]	GILGPKGD---RGFPSPGPPQAGLDGLPGPKGDIGPNQPGPIGPPGLPGIGL-QGPP	824
[Homo_sapiens]	GALGPKGD---RGFPSPGPPRTGLDGLPGPKGDVGPNGQPGPMGPPGLPGIGV-QGPP	824
[Canis_lupus_familiaris]	GTLGPKGD---RGFPSPGPPRTGLDGLPGPKGDVGPNGQPGPMGPPGLPGIGV-QGPP	824
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GPAGVAGPPGVPFIDGVRGRDGAKEPSPGLVMPGNKGRGAPGNDGPKGFAVGTGAP	976
[Caenorhabditis_elegans]	GRDGTPTGRGQDQ---GPGYSGEAGAPQNG---MDGYGAPDQGYGSPGQDGYPPGS	948
[Danio_rerio]	GPPGAPSGISGP---VPGANGKGRGPPGL-STPGFQDGRISGLPGPPGPPGPPGVP	875
[Xenopus_tropicalis]	GQPLGLPAGPPGPTGNTGIGKEKDPGAPGF-DMPGPPGDRGSPGPPGERGFTGPPGPP	880
[Protobothrops_mucrosquamatus]	GPPGLPGAPGPPG---VQGIPIGMDGPPPGF-DVPGPPGDRNPGFSGSPGLPGGPPGSP	896
[Gallus_gallus]	GPPGPPGVPVPPG---LQSVPEKGDPPPGF-DVPGPPGQGTTPGYPPGLPGPQGS	862
[Mus_musculus]	GPPGTPGPIGQPG---LHGIPGEKGDPPPGF-DVPGLPGERGSPGLPGAPGLIAPPGSP	880
[Rattus_norvegicus]	GPPGTPGPIGQPG---LHGIPGEKGDPPPGF-DVPGLPGERGSPGLPGAPGLIAPPGSP	880
[Bos_taurus]	GPPGTPGPIGQPG---LHGIPGEKGDPPPGF-DVSGPPGERGSPGIPGAPGPMGPPGSP	880
[Homo_sapiens]	GPPGTPGPIGQPG---LHGIPGEKGDPPPGF-DVPGPPGERGSPGIPGAPGPIAPPGSP	880
[Canis_lupus_familiaris]	GPPGTPGPIGQPG---LHGIPGEKGDPPPGF-DVLGPPGERGSPGIPGAPGPMGPPGTP	880
	* * * * *	
[Drosophila_melanogaster]	GKRGAPGIPGVSAKDKGATG---LTGNDGVPVGGPPGAPGLMGIKGDQGLAGAPGQ	1033
[Caenorhabditis_elegans]	GIPGEDGLVFPGLRGEHGDNLPLGLEGECEGSRGLDGVPGYPGEHGTDLPLPLGAD	1008
[Danio_rerio]	GRPGQDGLPLPGSKGEMSGMPPGSKGNPGN-----PGAPGFPGPKGDDGVPGQSGNP	929
[Xenopus_tropicalis]	GAQGRDGLPGFSAKGEVMGPPGSPVGPAGN-----PGNPLPGSKGNDGNPQPGLS	934
[Protobothrops_mucrosquamatus]	GSPGRDGTPIPGSKGEMVMGAPGQTSGS-----PGRNGFPGSKGNDGLSQGPQ	950
[Gallus_gallus]	GPPGRDGTPIPGFSAKGEVMGAPGPPPGT-----PGRSGLPLGLGNGLPGPPGPP	916
[Mus_musculus]	GVPKGAGVPPGFPVKGEMMMPGPPGPLGI-----PGRSGAPLKGDDGMQGPGLP	934
[Rattus_norvegicus]	GIPGRAGVPPGFPVKGEMMMPGPPGPLGI-----PGRSGAPLKGDDGMQGPGLP	934
[Bos_taurus]	GLPGKAGASGFPAGKEIGMMGPPGPPGLGI-----PGRSGVPLKGDGLQGPGLP	934
[Homo_sapiens]	GLPGKAGASGFPAGKEIGMMGPPGPPGLGI-----PGRSGVPLKGDGLQGPGLP	934
[Canis_lupus_familiaris]	GLPGKAGASGFPAGKEIGMMGPPGPPGLGI-----PGRSGVPLKGDGLQGPGLP	934
	* * * * *	

[Drosophila_melanogaster]	GLDGMPEKGNQGFPLDGPPLPGDAS-----EKQKQKEPSPSGRLGDTGPA	1081
[Caenorhabditis_elegans]	GQPGFVGEAGEPG---TPGYRGQPGEPNLAIPGQPGDVGYPGPDGPPGLPGQDGLPLGN	1065
[Danio_rerio]	GFPGLKDKGETG---IQPPPGIT-TST-SV-----LKQKQKESGVPGFSGPPGPK	975
[Xenopus_tropicalis]	GLPGAEGEKGERG---LPGPPGRV-DSANLQ-----FKVGKEPGLPGSSGLSGAK	981
[Protobothrops_mucrosquamatus]	GLAGQKSGKEPG---LPGVPKPF-DVNLLG-----SKGEKKEPGEKGNLGLTQK	997
[Gallus_gallus]	GPLGQKGVKEAG---LPGPPGTV-DPKQLG-----AKGEKKEPGEVPGIPGLSQK	963
[Mus_musculus]	GPAGEKGGKGEPP---LPGPPGPM-HPDFLG-----SKGEKKEPGLPGIPGLSGPK	981
[Rattus_norvegicus]	GPVGEKGGKGEPP---LPGPPGPM-RPDFLG-----SKGEKKEPGLPGIPGLSGPK	981
[Bos_taurus]	GPAGEKSGKGEPP---LPGPLGPM-DPDLG-----SKGEKKEPGLPGIPGVAGPK	981
[Homo_sapiens]	GPTGEKSGKGEPP---LPGPPGPM-DPDLG-----SKGEKKEPGLPGIPGVAGPK	981
[Canis_lupus_familiaris]	GPEGEKGGKGEPP---LPGPPGPM-DPDLG-----SKGEKKEPGLPGIPGVAGPK	981
	* *	
[Drosophila_melanogaster]	GTPGWPG---EKGLPLGA-VHGRAGPPGEKGDQGRSGIDGRDINGEKKEQGLQGVWGP	1138
[Caenorhabditis_elegans]	GERGNDGDSYPGNPLSGQPDAGYDGLDGVPPGPGYGITGMPLKKEGSLPLG---PG	1122
[Danio_rerio]	GITGISG---DPLGLPGQDGRPLPGPPGPKDAGLPGPSGATGLKAM	1023
[Xenopus_tropicalis]	GAAGLPG---NSGSPGQIGIPGSPGLPLKGDGSLPGQGTSGPPGLKMSM	1029
[Protobothrops_mucrosquamatus]	GYLGLPG---DPGPAGSVGQGAALPGPKGDTGILGPPGPAAGPGLKAM	1045
[Gallus_gallus]	GYYQLPG---DPGPGLSGPPGAPGLPGVKGDMGLPGQPGTGPPLKAM	1011
[Mus_musculus]	GYQGLPG---DPGQPLSGQPGSPGLPGPKGNPGLPGPPGLTGPPGPKGNI	1029
[Rattus_norvegicus]	GYQGLPG---DPGQPLSGQPGSPGLPGPKGTPLPGPPGLTGPPGPKGNI	1029
[Bos_taurus]	GYQGLPG---DPGQPLSGQPGPLPLAGPKGNPGLPGPPGLTGPPGPKGNI	1029
[Homo_sapiens]	GYQGLPG---DPGQPLSGQPGPLPGPKGNPGLPGPPGLTGPPGPKGNI	1029
[Canis_lupus_familiaris]	GYQGLPG---DPGQPLSGQPGPLPGPKGNPGLPGPPGLTGPPGPKGNI	1029
	* *	
[Drosophila_melanogaster]	EKGSVAPGPIPGAPGMDLPGAAGAPGAVGYPGDRDKGEPLS---GLPLKKEGTGPGVL	1196
[Caenorhabditis_elegans]	RQNGNDGIPGQPGLEGECEGDFPGSPGQPGYPGQGRGEKGY----PGIPGENGLPL	1177
[Danio_rerio]	--GEMGLPGVPVKGNSGQPGQPGPGSPGPGFPGPKGEAGVPVGYLPGNPMPKGEPT	1081
[Xenopus_tropicalis]	--GEMGLPGPPSGKSGSPGQPGPSGAGSPGSGLKGEKKEPGISGAGIPGFPQKGEPPG	1087
[Protobothrops_mucrosquamatus]	--GEMGLPGPTGSGKSGQIPGRPGQAGSPGSPGLKGDGDPGTSIGIPGPPGPKGESGL	1103
[Gallus_gallus]	--GEMGLPGPPSGKSGQIAGRPQPGPAGFPGLKGEKDPGLSSIGIPGLPGPKDGL	1069
[Mus_musculus]	--GDMGFPFGQVVDGPPPPGFPQPGSPGLPGQKSGKEPGVSGIGLPLPGPKGEPL	1087
[Rattus_norvegicus]	--GDMGFPFGQVVDGPPPPGFPQPGSPGLPGQKSGKEPGVSGIGLPLPGPKGEPL	1087
[Bos_taurus]	--GDMGFPFGQVVDGPPPPGFPQPGSPGLPGQKSGKEKDPGISGIGLPLPGAKGEPL	1087
[Homo_sapiens]	--GDMGFPFGQVVDGPPPPGFPQPGSPGLPGQKSGKEKDPGISGIGLPLPGAKGEPL	1087
[Canis_lupus_familiaris]	--GDMGFPFGQVVDGPPPPGFPQPGSPGLPGQKSGKEKDPGISGIGLPLPGAKGEPL	1087
	* *	
[Drosophila_melanogaster]	QGFITAGPQKGERGIRGQPLPATVPDIRGDKSGQGERGYTGEEKGEQERGLTGPAVAG	1256
[Caenorhabditis_elegans]	RQDQDQGLKGENGLDQPGYVPS---AQGLTPTGDVGYPGAPE-----NGDNGNQ	1227
[Danio_rerio]	PGFPGPAGLKGQPGFPQGLTGS---PGPKDPLPGFPQAGPNPGPKLDGAPGAG	1137
[Xenopus_tropicalis]	NGFPSPSGKGNPNPLPLPLGI---SGPKDPLPGFPSPGSPGLKGVDPGTGNSG	1143
[Protobothrops_mucrosquamatus]	PGYSGSPGAKSGFNGNPLPGSTGR---PGAKEPFPSPGPTPGVAGPKGFDGSA	1159
[Gallus_gallus]	PGYSPSPSGKGIAGNPLPLPLPS---PGAKEPGLPGFPPTPGIPGPKGIEGPPNPG	1125
[Mus_musculus]	PGYPGNPGIKGSVGTGLPLPLGN---PGAKEPGLPGFPPTPLPGPKGMNPPGNPG	1143
[Rattus_norvegicus]	PGYPGNPGIKGSVGTGLPLPLGN---PGAKEPGLPGFPPTPLPGPKGMNPPGNPG	1143
[Bos_taurus]	PGYPGNPGIKGSVGTGLPLPLGT---PGAKEPGLPGFPPTPLPGPKGISGPPNPG	1143
[Homo_sapiens]	PGYPGNPGIKGSVGTGLPLPLGT---PGAKEPGLPGFPPTPLPGPKGISGPPNPG	1143
[Canis_lupus_familiaris]	PGYPGNPGIKGSVGTGLPLPLGT---PGAKEPGLPGFPPTPLPGPKGISGPPNPG	1143
	* *	
[Drosophila_melanogaster]	AKGDRGLQGGPAGSLNIPGAKG-----DIGPRGEIGYGVITKKEKGLPR-----	1304
[Caenorhabditis_elegans]	RDGQPLRGESGQPGQPLGRDQPGVPGPPGDDGYPGAPGQDIYPPPGQAGQGYPL	1287
[Danio_rerio]	LNGAPRPGDPGRSGLPGIPGDKLAGRDIGPAGQKKEPLG---G-----	1182
[Xenopus_tropicalis]	LPGSGLRGESESRPGQPTGKEKQPGQDIPGPGSLKKEPGLPGFSGPLPG	1196
[Protobothrops_mucrosquamatus]	DPGPPGLPGEFGRPSGELLGKQPGQDIPGPAQKKEPGLPGFSGPLPG	1212
[Gallus_gallus]	LPGPFGVVDTRPGPPPPGPKQPGRDGIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1178
[Mus_musculus]	FPGEFGVAGGRPPPPPPGKKGKPGQDIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1196
[Rattus_norvegicus]	LPGEFGVVGGRPPPPPPGKKGKPGQDIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1196
[Bos_taurus]	LPGEFGVVGGRPPPPPPGKKGKPGQDIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1196
[Homo_sapiens]	LPGEFGVVGGRPPPPPPGKKGKPGQDIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1196
[Canis_lupus_familiaris]	LPGEFGVVGGRPPPPPPGKKGKPGQDIPGPAQKKEPGLPGFGRPPPG	1196
	* *	
[Drosophila_melanogaster]	---PGRNGRQGLIGAPLIGERLPLAGELVGLPGPIGPA-----KGER	1350
[Caenorhabditis_elegans]	DGLPLGAPFLNGEPSPGQYMPGLPGGPGESGLPGYPERGLPLG---DGKRGHD	1339
[Danio_rerio]	---QPLGKAGKDPGFGPAGSAGFPGLPGQIGSGVSGPPGGLPLQPGKGTG	1240
[Xenopus_tropicalis]	---LPGSQGQKGDAGLSGSPGNPLPGFKDQGFPGSPGPGTQPGPLPGPKTEGPKGDP	1254
[Protobothrops_mucrosquamatus]	---LQGLAGQKGDGSGSPGPPGPPGLKGEKAGKYPGNQGLEGPPVPGRASEGPKNP	1270
[Gallus_gallus]	---LPLSGQKGLGLPLPGPPGPPGLPLKKEPFGQGFGLQGGPPGGLPGPPLGPKGSP	1236
[Mus_musculus]	---LPLSGQKGDGGLPLPGNPLPGSKGEPGFGQGFPGMPGPPGPPGSPGPALEGPKNP	1254
[Rattus_norvegicus]	---LPLSGQKGDGGLPLPGNPLPGSKGEPGFGQGFPGMPGPPGPPGSPGPALEGPKNP	1254
[Bos_taurus]	---LPLSGQKGDGGLPLPGNPLPGSKGEPGFGQGFPGMPGPPGPPGSPGPALEG	

[Drosophila_melanogaster] GLAGSPGQPGQDGFPGAPGLKGDIT---GPQGFKGERGLNGFEGQKGDKDRGLQGPSGLP 1407

[Caenorhabditis_elegans] ---GLPGAPGVPGVEG-----VPLEGDCGDDGYPGAPGAPSGNGYPERGLPGVP 1387

[Danio_rerio] GPPGPPGR-----AGSGGVKGEKGLPGVPPTPGAGQKGDYGSPPGF 1282

[Xenopus_tropicalis] GPVGPGRPGPQGYGPPGSEGGPRGPPDGGFKGEKGNPGFPGQPLTGSKEHGASGFP 1314

[Protobothrops_mucrosquamatus] GSPGIPGRPGPPLSG---PEGPPPGPIGGVKGEKGNPGQPGQPLGLKGDQGTGES 1327

[Gallus_gallus] GPPGVPRPGPSPGYSGSPGEGPPGPPSGGLKGEKGNPGQPGQPLTGSKGDQGGPPGRQ 1296

[Mus_musculus] GPQGPGRPGPFGPGTGGPRGPPNGGKGERGNPGPPGQPLGLKGDQGGPPGLP 1314

[Rattus_norvegicus] GPQGPGRPGPFGPQGGPGTGGPRGPPNGGKGERGNPGPPGQPLGLKGDQGGPPGLP 1314

[Bos_taurus] GPQGPGRPGPTGFGQGGPGEGPRGLPGSGAIKGERGNPGQPGQPLGLKGDQGGPPGLQ 1314

[Homo_sapiens] GPQGPGRPG---GLPGPEGPPGLPGNGGKGEKGNPGQPGQPLGLKGDQGGPPGLQ 1308

[Canis_lupus_familiaris] GPQGPGRPGPTGFGQGLPGEGPRGLPGNGGKGERGNPGQPGQPLGLKGDQGGPPGLQ 1314

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] GLVGQKGDITGYPLNGNDG-FVGAPGERGFTGPKGRDGRDGTPLPGQKGEFGML----- 1461

[Caenorhabditis_elegans] GQQGRSGDNGYP-----G-APGQPGIKGPRGDDGFGRDGLDGLPGRPGEGLPMPAM 1440

[Danio_rerio] GSPGSPGPNGLKGDPPQG-VPGFPGSKGVSGPPGISGLPGARGDPDGKPPGPPGYAAE 1341

[Xenopus_tropicalis] GPPGRPLNGMKDQGVPG-VPGFPGMKGPGGPPGLAGLKGESGLPGAIGLPLPGPKGE 1373

[Protobothrops_mucrosquamatus] VSEKWEKPKALDVYFLTCVGFSGMKGPTGPLGAPGEGDPGPFSGPPGPIGPAGK 1387

[Gallus_gallus] GPPGRPLNGMKDQGVPG-VPGFPGMKGPTGAPAGLTGSQGLPGPPGPPGLPGTTGR 1355

[Mus_musculus] GNPGRPLNGMKDQGLPG-VPGFPGMKGPIGVPGSTGPDGEPGLTGPPGPPGLPGPSGQ 1373

[Rattus_norvegicus] GNPGRPLNGMKDQGLPG-VPGFPGMKGPIGVPGSTGPDGEPGLTGPPGPPGLPGPSGQ 1373

[Bos_taurus] GNPGRPLNGMKDQGLPG-VPGFPGMKGPSVPGSTGPEGDPGLTGPPGPPGLPGPSGQ 1373

[Homo_sapiens] GNPGRPLNGMKDQGLPG-VPGFPGMKGPSVPGSAGPEGEPGLTGPPGPPGLPGPSGQ 1367

[Canis_lupus_familiaris] GNPGRPLNGMKDQGLPG-VPGFPGMKGPSVPGSAGPEGDPGLVPGPPGPPGLPGPSGQ 1373

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] -----PPPGKGEPPGQPRNGPKGEPRGER-----GLIGIQGERG 1498

[Caenorhabditis_elegans] A---VRNPPGQPGENGYPGE---KGYPLPGDNLGSPPGKAGYPGAPGTDGYPPGPPGLSG 1495

[Danio_rerio] PIVLKGERGPPGPPGNGG---RQAG-----PIGLQLPGSPSSGS 1380

[Xenopus_tropicalis] YREIKGAPGLPGPPGRPGV---NGPPG-----PPGSPGLPGSLGLPG 1412

[Protobothrops_mucrosquamatus] TIVIKDQGGPPGLPGQPM---KGLSG-----LPGPPGLPGSIGLPG 1426

[Gallus_gallus] SIVVKDGPDPGPPGLPGS---KGPFG-----LAGPQGLPGVPVPG 1394

[Mus_musculus] SIVIKDGPDPGPPGPGPGL---KGLPG-----LPGPQGLPGPIGPPG 1412

[Rattus_norvegicus] SIVIKDGPDPGPPGPGPGL---KGLPG-----LPGPQGLPGPIGPPG 1412

[Bos_taurus] SIVIKDAGPPGPIGQPGGL---KGLQG-----LPGPQGLPGPIGPPG 1412

[Homo_sapiens] SIIIKDAGPPGPIGQPGGL---KGLPG-----PQGPQGLPGPTGPPG 1406

[Canis_lupus_familiaris] SIIIKDGVPPGPIGQPGGL---KGLPG-----LPGPQGLPGPIGPPG 1412

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] EKGERGLIGETGNVGRPGPKGDRGEPGERGYEGAIGLIGQKGEPAAPAAALDYLTGILI 1558

[Caenorhabditis_elegans] MPGHGGDQGFQGAAGRTGNPLPGTP-----GYPGSP---GGWAPSRGFTF 1538

[Danio_rerio] DPGPMGPPFNGPPGRKGDTPAGQPGQRGYPGPPGPDGAPGPPGIT---GTLGSAHGFLI 1438

[Xenopus_tropicalis] DTGRDGLPGFEGQLRKGDRGLPGQPGSRGNGPPGPDGLQGGPPGP---GLGSVAHGFLI 1470

[Protobothrops_mucrosquamatus] DFGHDGLPGFDGVPGRKGERGLPGQPGSRGSHGPPGPDGLQGGPPGP---GTGSAHGFLI 1484

[Gallus_gallus] DPGRDGLPGFDGAPGRKGERGLPGQPGSRGIQGGPPGPDGLQGGPPGP---GTASVAHGFLI 1452

[Mus_musculus] DPGRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGSRGLDGGPPGPDGLQGGPPGP---GTTSAHGFLI 1470

[Rattus_norvegicus] DPGRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGSRGLDGGPPGPDGLQGGPPGP---GTTSAHGFLI 1470

[Bos_taurus] DPGRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGTRGLDGGPPGPDGLQGGPPGP---GTSSIAHGFLI 1470

[Homo_sapiens] DPGRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGTRGLDGGPPGPDGLQGGPPGP---GTSSVAHGFLI 1464

[Canis_lupus_familiaris] DPGRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGTRGLDGGPPGPDGMQGGPPGP---GTSSIAHGFLI 1470

* * * * *

[Drosophila_melanogaster] TRHSQSETVPACSAHTELTWIGYSLLYVDGNDYAHNQDLGSPGSCVPRFSTLPVLSCGQN 1618

[Caenorhabditis_elegans] AKHSQITAVPQCPPGASQLWEGYSLLYVQGNRASQDLGQPGSCLSKFNTMPFMFCNIN 1598

[Danio_rerio] TRHSQITIEVPSQDGTSPYEGYSLLYVQGNRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1498

[Xenopus_tropicalis] TRHSQSTDAPGCPFGTIRIYDGYSLLYVQGNRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1530

[Protobothrops_mucrosquamatus] TRHSQITDSFPCPGTISRIYDGFSLLYVQGNRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1544

[Gallus_gallus] TRHSQITRDTPLCPQGTISRIYDGFSLLYVQGNRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1512

[Mus_musculus] TRHSQITEAPQCPRGTVHIYEGFSLLYVQGNKRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1530

[Rattus_norvegicus] TRHSQITDAPQCPQGTIVHIYDGFSLLYVQGNKRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1530

[Bos_taurus] TRHSQITDAPQCPQGTIQVYEGFSLLYVQGNKRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1530

[Homo_sapiens] TRHSQITDAPQCPQGTIQVYEGFSLLYVQGNKRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1524

[Canis_lupus_familiaris] TRHSQITDAPQCPHGTQIYEGFSLLYVQGNKRAHQDLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNIN 1530

::***: * * * * *:::*****: * * * * *:::***: * * * * *

[Drosophila_melanogaster] NVCNYASRNDKTFWLITNAIIPM---MPVENIEIRQYISRCVVCAPANVIAVHSQITIEVP 1676

[Caenorhabditis_elegans] SVCHVSSRNDYSFWLSTDEPMTPMNPVTGTAIRPYISRCVCEVPTQIIAVHSQDTSVP 1658

[Danio_rerio] NVCNFASRNDYSYWLSTPQPMPTMAPITGENIKPYISRCVCEAPAMVIAVHSQTIQLP 1558

[Xenopus_tropicalis] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMEPLRGRDIQPFISRCVCEAPAMVIAVHSQTIQIP 1590

[Protobothrops_mucrosquamatus] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMEPLTKNIQPFISRCTVCEAPAMVIAVHSQTIQIP 1604

[Gallus_gallus] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMEPLTGQNIQPFISRCVCEAPAMVIAVHSQTIQIP 1572

[Mus_musculus] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMMEPLKQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIP 1590

[Rattus_norvegicus] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMMEPLKQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIP 1590

[Bos_taurus] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMEPLKQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIP 1590

[Homo_sapiens] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSQPLKQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIP 1584

[Canis_lupus_familiaris] NVCNFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMEPLKQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIP 1590

..*:****::***: : * : * : * : * : * : * : * : *


```

[Drosophila_melanogaster] DCPNGWEGWLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCIFYET 1736
[Caenorhabditis_elegans] QCPQGWSGMWITGYSFVMHTAAGAEGTGQSLQSPGSCLEEFRAVPFIECHG-RGTCNYYAT 1717
[Danio_rerio] ACPENWDTLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYGN 1617
[Xenopus_tropicalis] QCPQGWSSWLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1649
[Protobothrops_mucrosquamatus] SCPQGWNSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1663
[Gallus_gallus] SCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1631
[Mus_musculus] HCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1649
[Rattus_norvegicus] HCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1649
[Bos_taurus] RCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1649
[Homo_sapiens] HCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1643
[Canis_lupus_familiaris] HCPHGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEAGSGQALASPGSCLEEFRSAPFIECHG-RGTCNYYAN 1649
** * . : * ***** : * * : * ***** : * : ***** * : * : * .

[Mus_musculus] MTSFWMYNLESSQPFERPPQQTIKAGERQSHVSRQVCMKNSS 1779
[Caenorhabditis_elegans] NHGFWLSIVDQDKQFRKPMSTLQAGGLKDRVSRQVCLNKR- 1759
[Danio_rerio] SYSFWLATVDVNEFMFRKPQSETLKAGNLRTRVSRQVCMKRT- 1659
[Xenopus_tropicalis] SYSFWLATVEMSEMFSPQSETLKAGDLRTRVSRQVCMKRT- 1691
[Protobothrops_mucrosquamatus] SYSFWLATVEISEMFNKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1705
[Gallus_gallus] SYSFWLATVEVSEMFSPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1673
[Mus_musculus] SYSFWLATVDMSDMFNKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1691
[Rattus_norvegicus] SYSFWLATVDMSDMFSKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1691
[Bos_taurus] SYSFWLATVDVSDMFSKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1691
[Homo_sapiens] SYSFWLATVDVSDMFSKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1685
[Canis_lupus_familiaris] SYSFWLATVDVSDMFSKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT- 1691
. * : : : . * : * . : * : * : : : * : * : * .

```

16. ábra A COL4A1 ortológ fehérjeszekvenciák illesztése a *Drosophila melanogaster*től a *Homo sapiens*ig;

NP_723046.1 (*D. melanogaster*, collagen alpha-1(IV)),
NP_001116702.1 (*Danio rerio*, collagen alpha-5(IV)),
XP_420320.2 (*Gallus gallus*, similar to alpha-5 type IV collagen),
XP_343779.2 (*Rattus norvegicus*, collagen alpha-5(IV)),
NP_031762.2 (*Mus musculus*, collagen alpha-5(IV)),
XP_001790185.1 (*Bos taurus*, collagen alpha-5(IV)),
NP_001002979.1 (*Canis lupus familiaris*, collagen alpha-5(IV)),
NP_000486.1 (*Homo sapiens*, collagen alpha-5(IV)),
NP_001022662.1 (*Caenorhabditis elegans*, collagen alpha-1(IV)),
XP_004916922.1 (*Xenopus tropicalis*, collagen alpha-5(IV)),
XP_015687838.1 (*Protobothrops mucrosquamatus*, collagen alpha-5(IV))

Dpse_XP_001355957.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGANAQFWKTAGTSGSIQDSVRHQSRREDPRDSFPIDDSYDIV 60
Dper_XP_002021501.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGANAQFWKTAGTSGSIQDSVRHQSRREDPRDSFPIDDSYDIV 60
Dmel_NP_723044.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGADAQFWKTAGTAGSIQDSVKHYNRNEPK--FPIDDSYDIV 58
Dsec_XP_002037904.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALFGADAQLWKMSTSGSIQDSVKHHNRNEPK--FSIDDSYDIV 58
Dere_XP_001968755.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGADAQFWKTSGTSGSIQDSVKQY--RNEPK--IPIDDSYDIV 57
Dyak_XP_002088685.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGADAQFWKTSGTSGSIQDSVKHYNRNEPK--IPIDDSYDIV 58
Dana_XP_001962982.1 MLPFWKRLLYAAVIAGALVGADAQFWRQSG--SGGIQPPYQPRNQDDQR--FPIDDSYDIV 57
Dvir_XP_002051848.1 MLAHWKRLLF AAVIAGVLVNTNAQFWKNPGATGSIQESVRHHSRDEPRESFTIDDSYDIV 60
.**:*****.*.:**:*.* :*.***. : : : : :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 DSASIQRGQPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGPKGVSGFPGQDGLGDK 120
Dper_XP_002021501.1 DSASIQRGQPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGPKGVSGFPGQDGLGDK 120
Dmel_NP_723044.1 DSAGVARGDLPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGLKGMGFPGMEGPGSGDK 118
Dsec_XP_002037904.1 SSA----GNLPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGLKGMGFPGMEGPGSGDK 114
Dere_XP_001968755.1 DSA----GNLPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGLKGMGFPGMEGPGSGDK 113
Dyak_XP_002088685.1 DSA----GNLPPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPLGPTGLKGMGFPGMEGPGSGDK 114
Dana_XP_001962982.1 DSAGVQRGDPLPKNCTAGYAGCVPKCAIAEKGNRGLPGPSGSGPKGAQGFPGSEGPAGDK 117
Dvir_XP_002051848.1 DSASIQRGQPPKNCTSGFAGCMPKCAIAEKGNRGLPGPEGQIGPKGIKGYSGPEGPPGDK 120
.** * . *****:*****:*****:*****.* * * * * * :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGQIPGLPGVGGVQSSGNPGLPGINGKDCDGSGLPLGLQ 180
Dper_XP_002021501.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGQIPGLPGVGGVQSSGNPGLPGINGKDCDGSGLPLGLQ 180
Dmel_NP_723044.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGPLHGQAGVPGVQGPAGNPGAPGINKDCDGDGIPGLE 178
Dsec_XP_002037904.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGPLHGQAGVPGVQGPAGNPGAPGINKDCDGDVGLSGL 174
Dere_XP_001968755.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGPLHGQAGVPGAQGPAGNPGAPGINKDCDGEDGIAGLE 173
Dyak_XP_002088685.1 GQKGDPPGYGLRGDKGERGSGPLHGQAGVPGVQGPAGNPGAPGINKDCDGDGIPGLE 174
Dana_XP_001962982.1 GQKGDPPGYGLRGAKGERGLQGMHLPLGIAGIPGSAGNPGAPGLNGKDCDGSGLPLGLQ 177
Dvir_XP_002051848.1 GQKGDPPGFARGYKGERGTGIPGLPGVSGVQGPAGNPGAPGINKDCDGSGLPLGLQ 180
*****:* * * * * * * : * * * * * * :*****:*****.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 GLSGMAGPRGFPSPGGKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGFTGRSGYAGPQGNPGDKGER 240
Dper_XP_002021501.1 GLSGMAGPRGFPSPGGKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGFTGRSGYAGPQGNPGDKGER 240
Dmel_NP_723044.1 GLSGMPGPRGYAGQLGSKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGWRGTAGLAGPQGFPGKEKER 238
Dsec_XP_002037904.1 GLSGMPGPRGYAGQLGSKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGWRGTAGLAGPQGLPGEKER 234
Dere_XP_001968755.1 GLSGMPGPRGYAGQLGSKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGWRGTAGLAGPQGLPGEKER 233
Dyak_XP_002088685.1 GLSGMQGPRGFAGQLGSKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGWGTAGLAGPQGLPGEKER 234
Dana_XP_001962982.1 GLSGMQGPRGYPGIAGAKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGFSGRSGYAGPQGAPGEKQOR 237
Dvir_XP_002051848.1 GLSGMAGPRGYPGGPGLKGEKGEPAKENGNYAKGEKGEPPGFAGRSYGPPEGQREKGER 240
*****:*****.* * *****:*****:*****:*****.* * * * * * :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 GDTGPPYSGKGLRGDRGIKGEKGDSCFGPLMPGKQGEKGEKGDPAVPIPVITGSERVSGPRG 300
Dper_XP_002021501.1 GDTGPPYSGKGLRGDRGIKGEKGDSCFGPLMPGKQGEKGEKGDPAVPIPVITGSERVSGPRG 300
Dmel_NP_723044.1 GDSGPYAGKPRGEHGLKGEKASCYGPMPKPGAPGIKGEKGEPAASSFPVKPHTVMGPRG 298
Dsec_XP_002037904.1 GDSGPYAGKPRGEHGLKGEKASCYGPMPKPGAPGMKGEKGEPAASSLPKPTHTVMGPRG 294
Dere_XP_001968755.1 GDSGPYAGKPRGEHGLKGEKASCYGPMPKPGAPGIKGEKGEPAASSLPKPTHTVMGPRG 293
Dyak_XP_002088685.1 GDSGPYAGKPRGEHGLKGEKASCYGPMPKPGSPGIKGEKGEPAASSLPKPTHTVMGPRG 294
Dana_XP_001962982.1 GETGPPYAGKPRGDYGLKGEKGDSCFGPLKPGDKDKGEKGEPAVKLPSTGVSIELGPRG 297
Dvir_XP_002051848.1 GDTGPPYPPGPRGDRGIKGEKGAACFATAMPGEKDKGEKGDPAKPLPVHGSDDTVMGQRG 300
*:*****.* * * :*****:*****:*****.* * * * * * :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 DPGQKGEVGPYGEKGLPGGPEPGQDQKGEKGLPGGSGDRGRQGNFGPPGPGSQKGD RG 360
Dper_XP_002021501.1 DPGQKGEVGPYGEKGLPGGPEPGQDQKGEKGLPGGSGDRGRQGNFGPPGPGSQKGD RG 360
Dmel_NP_723044.1 DMGQKGEVGLVRGKGEPPGEGDTGLDQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGSTGQKGD RG 358
Dsec_XP_002037904.1 DMGQKGEVGLVRGKGEPPGEGDTGLNGQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGSTGQKGD RG 354
Dere_XP_001968755.1 DTGQKGEQGRDGRKGEPPLEGETGADGQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGSTGQKGD RG 353
Dyak_XP_002088685.1 DLGQKGEVGLVRGKGEPPGEGDTGVDGQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGSTGQKGD RG 354
Dana_XP_001962982.1 EEGQKGEVGLVRGKGEAGQVDTGLDQKGEKGLPGGPGDRGRQGNFGPPGPGSQKGD RG 357
Dvir_XP_002051848.1 DVGQKGEIGPMGEKGGGLPGVGPBGHDGQKGEKGLPGGAGERGRQGNFGPPGPAGQKGD RG 360
: *****.* * * * * * * :*****:*****:*****.* * * * * * :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 ETGLNGLPGSFGQKGEPPRGPGSGQRGLVGPFPFGGGRGPAGPFGKPRGYTGTPGPQ 420
Dper_XP_002021501.1 ETGLNGLPGSFGQKGEPPRGPGSGQRGLVGPFPFGGGRGPAGPFGKPRGYTGTPGPQ 420
Dmel_NP_723044.1 EPGLNGLPGNPGQKGEPPRGAGATGKPLLGPFPFGGGRGTPGPPGPKPRGYVGTGPQ 418
Dsec_XP_002037904.1 EPGLNGLPGKPGQKGEPPRGAGATGQPLLGPFPFGGGRGTPGPPGPKPRGYVGTGPQ 414
Dere_XP_001968755.1 EPGLNGLPGSTGQKGEPPLAGATGQPLLGPFPFGGGRGTPGPPGPKPRGYSGKPGPQ 413
Dyak_XP_002088685.1 EPGLNGLPGNPGKGEAGRPGETGQQLGIPFPFGGGRGNPGPPGPKPRGYVGTGPQ 414
Dana_XP_001962982.1 ETGLNGLPGNPGQKGEPPRGSTGQQLVGPFPFGGGRGTPGPPGPKPRGYAGPPGPQ 417
Dvir_XP_002051848.1 ETGLNGLPGQPLKGEPPRPNSEGRGLVGPFPFGGGRGPAGPFGKPRGYTGQPGPQ 420
*.*****.* * * * * * * :*****:*****:*****.* * * * * * :.***:*****

Dpse_XP_001355957.1 GLNGADGQPGPQGYVQKGGSGMPGRPGGEPFGQKGEKIGGRVPGQPGVPIGHTGPP 480
Dper_XP_002021501.1 GLNGADGQPGPQGYVQKGGSGMPGRPGGEPFGQKGEKIGGRVPGQPGVPIGHTGPP 480
Dmel_NP_723044.1 GLNGVDGLPGPQGYNGQKGGAGLGRPGNEGPPGKKGEKGTAGLNGPKGSIGPIGHGPPP 478
Dsec_XP_002037904.1 GLSGADGLPGSQGYNGQKGGAGLGRPGNEGPPGKKGDKGTAGLDGPKGSIGPIGHGPPP 474
Dere_XP_001968755.1 GLNGNDGLPGPQGYTGQKGGAGLPGQNGNEGPPGKKGEKGTAGLNGPKGSIGPIGHGPPP 473
Dyak_XP_002088685.1 GLNGADGQPGPQGYTGQKGGVGLGRPGNEGPPGKKGEKGTAGLDGPKGSIGPIGHGPPP 474
Dana_XP_001962982.1 GLNGADGQPGPQGYTGQKGGTGMGRPGGEGLPQKGEKIGGRDGPQPGVPGVGHGPPP 477
Dvir_XP_002051848.1 GLNGMDGPIGPQGYIGPKGGPGVPGHPGNEGPAQKGEKGNAGRLGSQPGVPIGHNGPP 480
.* ** * * * ** * :*: ** .*:*:** * *:*:*:** **

Dpse_XP_001355957.1 GPEGQKGDAGTPGYGIEGPKGDDGNPGYPGQKGGKGERGFKGNSGVPDGSKLGRPGTGN 540
Dper_XP_002021501.1 GPEGQKGDAGTPGYGIEGPKGDDGNPGYPGQKGGKGERGFKGNSGVPDGSKLGRPGTGN 540
Dmel_NP_723044.1 GPEGQKGDAGLPGYGIQGSKGADAGIPGYPGLKGSKGERGFKGNAGAPGDSKLGRPGTPGA 538
Dsec_XP_002037904.1 GPEGQKGDAGLPGYGIQGSKGADAGIPGYPGLKGSKGERGFKGNAGAPGDSKLGRPGTGN 534
Dere_XP_001968755.1 GPEGQKGEAGMPGYGIQGSKGDAGKPGYPGLKGSKGERGFKGNAGAPGDSKLGRSGPPGL 533
Dyak_XP_002088685.1 GPEGQKGDAGLPGYGIQGSKGDAGVPGYPGLKGSKGERGFKGNAGAPGDSKLGRPGTGN 534
Dana_XP_001962982.1 GPEGQKGDSDGPGYGTGQPKGNDGYPGRPLGAKGERGFKGVAGVPDGSKLGRPGTGN 537
Dvir_XP_002051848.1 GPEGQKGEPTPGYGIQGSKGGDDGNGYPGQKGSKGERGFKGNAGVPDGSKLGRPGTGN 540
*****:.* **** :* **: * * .* *****:.* :*****.* **

Dpse_XP_001355957.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGAKGDMGIKGDIGGKCSSCPPLKGDKGTGLDGPNGPVRGP 600
Dper_XP_002021501.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGAKGDMGIKGDIGGKCSSCPPLKGDKGTGLDGPNGPVRGP 600
Dmel_NP_723044.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGAKGDMGIKGDVGGKCSSCRAGPKGDKGTSGLPGIPGKDGARGP 598
Dsec_XP_002037904.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGQKGDGIKGDVGGKCSSCRAGPKGDKGTSGLAGVPKDGARGP 594
Dere_XP_001968755.1 AGAPGQKGDPRPGPIHGQKGDGIKGDVGGKCSSCRAGPKGEKGTSGLPPIGKDGVRGP 593
Dyak_XP_002088685.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGQKGDGIKGDVGGKCSSCRAGPKGDKGTSGLVGVAGKDGARGP 594
Dana_XP_001962982.1 AGAPGQKGDAGRPGTPGQKGDGIKGDVGGKCSLCPQKQKGDKGTGLDGPNGVARGP 597
Dvir_XP_002051848.1 AGIPGPQGDAGRDGIPGDKGDMGPKGDAGGKCSSCPPLKGDKGERGLNGIPNGPARGP 600
** ** :*:** * * ***:** ** ** ** * ***:** ** *:*:** **

Dpse_XP_001355957.1 PGEFGHQGERGHDGINGQTGAPGEKGEDGLTGAPGATGAPGKGAIIYNSQIKTEKGEKQ 660
Dper_XP_002021501.1 PGEFGHQGERGHDGINGQTGAPGEKGEDGLTGAPGATGAPGKGAIIYNSQIKTEKGEKQ 660
Dmel_NP_723044.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGKPALCDLSLIEPLKDGKGY 658
Dsec_XP_002037904.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGKPALCDLSLIEPLKDGKGY 654
Dere_XP_001968755.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGRPAMVDLNSVAAEKDGKGS 653
Dyak_XP_002088685.1 PGEKGVPERGHDGINGRPPGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGRPAMVDLNLVKAERKEKGY 654
Dana_XP_001962982.1 PGERGYPERGSDGINGQTGPPGLRGEDGVPVGPVGEAGQNAIQNLSLVIPIHKEKGN 657
Dvir_XP_002051848.1 PGERGYVGERDDGIIGQMGPPGEKGGDDGYPGAPGATGKPGQSAFVDSQIVPEKGPKE 660
*** * **** ** *: ** :*:** * **.* .*: **: . : . : * **

Dpse_XP_001355957.1 PGEFGHQGERGHDGINGQTGAPGEKGEDGLTGAPGATGAPGKGAIIYNSQIKTEKGEKQ 660
Dper_XP_002021501.1 PGEFGHQGERGHDGINGQTGAPGEKGEDGLTGAPGATGAPGKGAIIYNSQIKTEKGEKQ 660
Dmel_NP_723044.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGKPALCDLSLIEPLKDGKGY 658
Dsec_XP_002037904.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGKPALCDLSLIEPLKDGKGY 654
Dere_XP_001968755.1 PGERGYPERGHDGINGQTGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGRPAMVDLNSVAAEKDGKGS 653
Dyak_XP_002088685.1 PGEKGVPERGHDGINGRPPGPPGEKGEDGRTGLPGATGEPGRPAMVDLNLVKAERKEKGY 654
Dana_XP_001962982.1 PGERGYPERGSDGINGQTGPPGLRGEDGVPVGPVGEAGQNAIQNLSLVIPIHKEKGN 657
Dvir_XP_002051848.1 PGERGYVGERDDGIIGQMGPPGEKGGDDGYPGAPGATGKPGQSAFVDSQIVPEKGPKE 660
*** * **** ** *: ** :*:** * **.* .*: **: . : . : * **

Dpse_XP_001355957.1 PGLPGAAGVKGDRGESGVPGLAGVKEMGFKGDKGYTGQAGTDGIPGAPGRDGYDGAPGL 720
Dper_XP_002021501.1 PGLPGAAGVKGDRGESGVPGLAGVKEMGFKGDKGYTGQAGTDGIPGAPGRDGYDGAPGL 720
Dmel_NP_723044.1 PGAPGAKGVQGFKAEGLPPIGPKGEFGFKGEKGLSGAPGNDGTPGRAGRDPGYPGIPGQ 718
Dsec_XP_002037904.1 PGAPGAKGVKGFGRSDGQSGSPGPKGEFGFKGDKGLSGAPGNDGTPGRAGRDPGYPGIPGQ 714
Dere_XP_001968755.1 PGAPGAKGVKGFSGADGFPNGDPKGEFGFKGEKGLSGAPGNDGTPGRAGRDPGYPGIPGQ 713
Dyak_XP_002088685.1 PGLPGAAGVKGFRGADGLPNPGEKGEFGFKGDKGQSGVPNGDIPGRAGRDPGYPGSPGQ 714
Dana_XP_001962982.1 PGYPGAAGVKGGERDGIIPGQPGIKGEFGIKGDKGLTGFPAGDAPGAPGRDGYNGAPGL 717
Dvir_XP_002051848.1 PGYPGAAGVKGGERDGIIPGAPGLKEMGVKDKGYMGQAGTDGSPGSPGRDGVDFGFPQ 720
** ** ***:** * .* .* * ***:** ** ** * .* ** ** .***** **

Dpse_XP_001355957.1 SIKGESGRGMDGLKDKGTAGYVGPKEPGTCEASELKIIPAKGNKGDRGATGMPGVDGP 780
Dper_XP_002021501.1 SIKGESGRGMDGLKDKGTAGYVGPKEPGTCEASELKIIPAKGNKGDRGATGMPGVDGP 780
Dmel_NP_723044.1 SIKGEPGFHGRDGAAGDKGSGFRSGEKGEPGSCALDEIKMPAKGNKGEPGQTGMPPGPE 778
Dsec_XP_002037904.1 SIKGEPGFHGRDGAAGDKGSLGSPGERGEPGSCALDEIKMPAKGNKGEPGQTGMPPGPE 774
Dere_XP_001968755.1 AIKGEFGNRRDGEKDKGSGFRSGEKGEPGSCALDEIKAIKAIKGEKPGQTGMPPGSPGR 773
Dyak_XP_002088685.1 SIKGEPGFHGRDGAAGDKGSGFRSGEKGEPGSCALDEIKMPAKGNKGEPGQTGMPPGPE 774
Dana_XP_001962982.1 TIKGEPGTGPDGLKDKGTAGYVGPKEPGTCEIDLRMPAKGSKGERGATGMPGPEGP 777
Dvir_XP_002051848.1 SIKGEPGRPGFDGKDKGTAGYVGPKEPGTCEASELKVPLKGNKGEGATGMPGPNGP 780
:****.* ** ** ***:** * * :****:* :*: ***:** * ** ** *


```

Dpse_XP_001355957.1  GQNNICNYASRNDKTFWLSTSAPIPMMPVENYEISKYISRCVVCEAPANVIAMHSQSLEI 1679
Dper_XP_002021501.1  GQNNICNYASRNDKTFWLSTSAPIPMMPVENYEISKYISRCVVCEAPANVIAMHSQSLEI 1657
Dmel_NP_723044.1     GQNNVCNYASRNDKTFWLTTNAAIPMPVENIEIRQYISRCVVCEAPANVIAVHSQTIEV 1675
Dsec_XP_002037904.1  GQNSVCNYASRNDKTFWLTTNAAIPMPVANNEIRQYISRCVVCEAPANVIAVHSQTIAV 1672
Dere_XP_001968755.1  GQNNICNYASRNDKTFWLTTNAAIPMPVEKNEIRQFISRCVVCEVPANVIAVHSQTIEV 1672
Dyak_XP_002088685.1  SQNNVCNYASRNDKTFWLTTSAIPMPVENDEIRNFISRCVVCEAPANVIALHSQTLEI 1673
Dana_XP_001962982.1  GQNNICNYASRNDKTFWLSTSAPLPMMPVENYEINKYISRCVVCEAPANVIAVHSQSLEI 1676
Dvir_XP_002051848.1  GQNNVCNYASRNDKSFWLSTSAPIPMMPVNNNEISKYISRCVVCEAPANVIAVHSQSLAI 1679
                      .**.:*****:***:*.:.***** : ** :*****.*****:***: :

Dpse_XP_001355957.1  PECPSGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFYE 1739
Dper_XP_002021501.1  PECPSGWEGLWIPV----- 1670
Dmel_NP_723044.1     PDCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFYE 1735
Dsec_XP_002037904.1  PDCPNGWESLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFYE 1732
Dere_XP_001968755.1  PECPNGWESLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSTGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFYE 1732
Dyak_XP_002088685.1  PSCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFYE 1733
Dana_XP_001962982.1  PNCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGTCHFFE 1736
Dvir_XP_002051848.1  PNCPNGWEGLWIGYSFLMHTAVGNNGGGQALQSPGSCLEDFRATPFIECNGAKGHCHFYE 1739
                      *.**.***.*

Dpse_XP_001355957.1  TMTSFWMVTILESDQFEKPQQQTIKSGNLLSRVSRQCQVCMKNSS 1783
Dper_XP_002021501.1  -----
Dmel_NP_723044.1     TMTSFWMYNLESSQPFERPPQQQTIKAGERQSHVSRQCQVCMKNSS 1779
Dsec_XP_002037904.1  TLTSFWMYNLDSSEPFDMPPQQQTIKSGKQQSYVSRQCQVCMKNSS 1776
Dere_XP_001968755.1  TMTSFWMFNLDAPPFERPPQQQTMKAGDRQRNVSRQCQVCMKNSS 1776
Dyak_XP_002088685.1  TMTSFWLYNLDTTPFAKPQQQTIKAGNQLSGVSRQCQVCMKNSS 1777
Dana_XP_001962982.1  TMTSFWMVTQENGDFQKPEQQTIKAGNLLTRVSRQCQVCMKNSS 1780
Dvir_XP_002051848.1  TMTSFWMVTLEDGDQFQRPQQQTIKAGNLLSRVSRQSV----- 1778

```

17. ábra A COL4A1 ortológ fehérjeszekvenciák illesztése a *Drosophilidae* családon belül:
 NP_723044.1 (*D. melanogaster*), XP_002037904.1 (*D. sechellia*),
 XP_001968755.1 (*D. erecta*), XP_002088685.1 (*D. yakuba*),
 XP_001355957.1 (*D. pseudoobscura*), XP_001962982.1 (*D. ananassae*),
 XP_002021501.1 (*D. persimilis*), XP_002051848.1 (*D. virilis*)

A mutánsban felül, a vad típusban alulexpresszált

Szisztematikus név	Szimbólum	Gén	log2 (O29/O18)	O29/O18 p-érték	log2 (D29/D18)	D29/D18 p-érték	GO ID	GO (génontológiai) kifejezés	Bizonyíték	Hivatkozás, megjegyzés
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16510152
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16291998
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0006959	humoral immune response	IEP	PMID:16510152
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0019731	antibacterial humoral response	IEP	PMID:9405661
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0019731	antibacterial humoral response	NAS	FB:FBrf0124035
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	IEP	PMID:9405661
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	NAS	PMID:10767526
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0042742	defense response to bacterium	TAS	PMID:10793472
FBgn0012042	AttA	Attacin-A	-2,29	0,00485	3,19	0,00318	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	IEP	PMID:18654628
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16510152
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16291998
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0006959	humoral immune response	IEP	PMID:16510152
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0019731	antibacterial humoral response	IDA	PMID:9736738
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0019731	antibacterial humoral response	NAS	FB:FBrf0126316
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0019731	antibacterial humoral response	ISS	FB:FBrf0132635 FB:FBgn0012042
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0042742	defense response to bacterium	NAS	FB:FBrf0126316
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0003674	molecular_function	ND	FB:FBrf0159398
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0005576	extracellular region	IDA	PMID:9736738
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	IEP	PMID:18654628
FBgn0041579	AttC	Attacin-C	-2,22	0,00743	3,42	0,00145	GO:0006952	defense response	IDA	PMID:9736738
FBgn0036361	CG10154	CG10154	-3,07	0,00115	1,80	0,00168	GO:0006030	chitin metabolic process	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0036361	CG10154	CG10154	-3,07	0,00115	1,80	0,00168	GO:0008061	chitin binding	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0036361	CG10154	CG10154	-3,07	0,00115	1,80	0,00168	GO:0016490	structural constituent of peritrophic membrane	ISS	FB:FBrf0105495 EMBL:AF000606

FBgn0036361	CG10154	CG10154	-3,07	0,00115	1,80	0,00168	GO:0005576	extracellular region	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0036362	CG10725	CG10725	-1,45	0,00206	1,15	0,00359	GO:0006030	chitin metabolic process	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0036362	CG10725	CG10725	-1,45	0,00206	1,15	0,00359	GO:0008061	chitin binding	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0036362	CG10725	CG10725	-1,45	0,00206	1,15	0,00359	GO:0016490	structural constituent of peritrophic membrane	ISS	FB:FBrf0105495 EMBL:AF026492
FBgn0036362	CG10725	CG10725	-1,45	0,00206	1,15	0,00359	GO:0005576	extracellular region	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0006508	proteolysis	NAS	PMID:12568721
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0006508	proteolysis	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR001254 InterPro:IPR001314 InterPro:IPR018114
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0006508	proteolysis	ISM	PMID:19546158
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	NAS	PMID:12568721
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR001254 InterPro:IPR001314 InterPro:IPR018114
FBgn0042187	CG17234	CG17234	-1,09	0,00767	2,68	0,00003	GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	ISM	PMID:19546158
FBgn0051091	CG31091	CG31091	-1,59	0,00302	2,44	0,00235	GO:0004806	triglyceride lipase activity	ISS	FB:FBrf0148886 UniProtKB:Q29458
FBgn0051091	CG31091	CG31091	-1,59	0,00302	2,44	0,00235	GO:0006629	lipid metabolic process	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR006693
FBgn0038074	CG6188	CG6188	-1,11	0,00224	1,16	0,00631	GO:0017174	glycine N-methyltransferase activity	ISS	FB:FBrf0105495 UniProtKB:Q29513
FBgn0034143	CG8303	CG8303	-0,95	0,00654	1,13	0,00914	GO:0080019	fatty-acyl-CoA reductase (alcohol-forming) activity	ISS	PMID:2275891 HGNC:26222
FBgn0034783	CG9825	CG9825	-1,75	0,00191	1,25	0,00576	GO:0005316	high affinity inorganic phosphate:sodium symporter activity	ISS	FB:FBrf0105495 NCBI_gi:4885441
FBgn0034783	CG9825	CG9825	-1,75	0,00191	1,25	0,00576	GO:0016021	integral to membrane	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR011701
FBgn0034783	CG9825	CG9825	-1,75	0,00191	1,25	0,00576	GO:0055085	transmembrane transport	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR011701
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0045087	innate immune response	NAS	PMID:15797611
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0009617	response to bacterium	IDA	PMID:19046341

FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0019731	antibacterial humoral response	IEP	PMID:2125051
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0019731	antibacterial humoral response	IEP	PMID:9405661
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0019731	antibacterial humoral response	NAS	FB:FBrf0123830
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	IEP	PMID:9405661
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	IMP	PMID:19520911
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0045089	positive regulation of innate immune response	IMP	PMID:19520911
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0042742	defense response to bacterium	ISS	PMID:2125051
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0042742	defense response to bacterium	TAS	PMID:10793472
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0042742	defense response to bacterium	NAS	PMID:11283698
FBgn0004240	Dpt	Diptericin	-5,44	0,00152	4,43	0,00175	GO:0005576	extracellular region	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR005521
FBgn0034407	DptB	Diptericin B	-3,40	0,00107	3,67	0,00247	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16510152
FBgn0034407	DptB	Diptericin B	-3,40	0,00107	3,67	0,00247	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:16291998
FBgn0034407	DptB	Diptericin B	-3,40	0,00107	3,67	0,00247	GO:0006959	humoral immune response	IEP	PMID:16510152
FBgn0034407	DptB	Diptericin B	-3,40	0,00107	3,67	0,00247	GO:0019731	antibacterial humoral response	ISS	FB:FBrf0132637
FBgn0034407	DptB	Diptericin B	-3,40	0,00107	3,67	0,00247	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	IEP	PMID:18654628
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0003796	lysozyme activity	ISS	PMID:8159165
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0003796	lysozyme activity	ISS	FB:FBrf0105495 UniProtKB:Q7M437
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0003796	lysozyme activity	NAS	FB:FBrf0133282
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0003796	lysozyme activity	NAS	FB:FBrf0156715
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0019730	antimicrobial humoral response	NAS	FB:FBrf0133282
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR000974
FBgn0004431	LysX	Lysozyme X	-1,93	0,00092	1,31	0,00145	GO:0006952	defense response	ISS	FB:FBrf0105495 UniProtKB:Q7M437
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019732	antifungal humoral response	IEP	PMID:9405661
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019732	antifungal humoral response	NAS	FB:FBrf0124307
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019732	antifungal humoral response	TAS	PMID:15032585
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0009617	response to bacterium	IDA	PMID:19237508

FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019731	antibacterial humoral response	IEP	PMID:7588819
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019731	antibacterial humoral response	IEP	PMID:9405661
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0019731	antibacterial humoral response	NAS	FB:FBBrf0124307
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	IMP	PMID:18550807
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0005576	extracellular region	IDA	PMID:9736738
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	IDA	PMID:7588819
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	NAS	FB:FBBrf0124307
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	TAS	PMID:10793472
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050832	defense response to fungus	IDA	PMID:7588819
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050832	defense response to fungus	TAS	PMID:10793472
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0050832	defense response to fungus	TAS	PMID:11283698
FBgn0014865	Mtk	Metchnikowin	-3,35	0,00098	5,02	0,00237	GO:0006952	defense response	IDA	PMID:9736738
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0009253	peptidoglycan catabolic process	ISS	PMID:12496260 FB:FBgn0033327
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0005887	integral to plasma membrane	NAS	FB:FBBrf0133282
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0042834	peptidoglycan binding	ISS	PMID:11106397 UniProtKB:O76537
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0042834	peptidoglycan binding	NAS	FB:FBBrf0133282
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0042834	peptidoglycan binding	ISS	PMID:12496260 FB:FBgn0033327
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0005875	microtubule associated complex	IDA	PMID:18433294
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0008745	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity	ISS	PMID:12496260 FB:FBgn0033327
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0008745	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity	IDA	PMID:21364998
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0008270	zinc ion binding	IEA	FB:FBBrf0174215 InterPro:IPR006619
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0005576	extracellular region	ISS	PMID:11106397
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0005576	extracellular region	ISS	PMID:15199956
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0006952	defense response	NAS	FB:FBBrf0133282
FBgn0043578	PGRP-SB1	PGRP-SB1	-1,22	0,00929	1,41	0,00145	GO:0006955	immune response	ISS	PMID:11106397 UniProtKB:O76537

FBgn0040069	vanin-like	vanin-like	-1,13	0,00066	1,26	0,00093	GO:0019898	extrinsic to membrane	NAS	FB:FBF0136641
FBgn0040069	vanin-like	vanin-like	-1,13	0,00066	1,26	0,00093	GO:0017159	pantetheine hydrolase activity	ISS	FB:FBF0148886 UniProtKB:Q9Z0K8
FBgn0040069	vanin-like	vanin-like	-1,13	0,00066	1,26	0,00093	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	IEA	FB:FBF0174215 InterPro:IPR003010

A mutánsban alul, a vad típusban felülexpresszált

Szisztematikus név	Szimbólum	Gén	log2 (O29/O18)	O29/O18 p-érték	log2 (D29/D18)	D29/D18 p-érték	GO ID	GO (génontológiai) kifejezés	Bizonyíték	Hivatkozás, megjegyzés
FBgn0036600	CG13043	CG13043	1,42	0,002024	-2,97	0,00078	unknown	unknown		Retinin C domain (expressed only in larval trachea; predicted cuticle proteins: PMC3701952); rich in alanine and valine

A mutánsban és a vad típusban is felülexpresszált

Szisztematikus név	Szimbólum	Gén	log2 (O29/O18)	O29/O18 p-érték	log2 (D29/D18)	D29/D18 p-érték	GO ID	GO (génontológiai) kifejezés	Bizonyíték	Hivatkozás, megjegyzés
FBgn0053830	His3:CG33830	His3:CG33830	2,49	0,001652	1,00	0,001626	GO:0003677	DNA binding	ISS	FB:FBF0182792 UniProtKB:P02299
FBgn0053830	His3:CG33830	His3:CG33830	2,49	0,001652	1,00	0,001626	GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	ISS	FB:FBF0182792 UniProtKB:P02299
FBgn0053830	His3:CG33830	His3:CG33830	2,49	0,001652	1,00	0,001626	GO:0006334	nucleosome assembly	IEA	FB:FBF0174215 InterPro:IPR000164
FBgn0053830	His3:CG33830	His3:CG33830	2,49	0,001652	1,00	0,001626	GO:0046982	protein heterodimerization activity	IEA	FB:FBF0174215 InterPro:IPR009072
FBgn0053830	His3:CG33830	His3:CG33830	2,49	0,001652	1,00	0,001626	GO:0000786	nucleosome	ISS	FB:FBF0182792 UniProtKB:P02299
FBgn0034291	CG5770	CG5770	2,44	0,002912	1,43	0,00021	unknown	unknown		expressed only in midgut; rich in aspartic acid; Drosophilidae specific
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0009408	response to heat	ISS	FB:FBF0105495 EMBL:U96099
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0009408	response to heat	NAS	FB:FBF0123333
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0009408	response to heat	IMP	PMID:14734639
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0006979	response to oxidative stress	IMP	PMID:14734639
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0008340	determination of adult lifespan	IMP	PMID:14734639
FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0008340	determination of adult lifespan	IMP	PMID:15331597

FBgn0001223	Hsp22	Heat shock protein 22	1,07	0,00247	2,13	0,00183	GO:0042026	protein refolding	NAS	FB:FBrf0123333
-------------	-------	-----------------------	------	---------	------	---------	------------	-------------------	-----	----------------

A mutánsban és a vad típusban is alulexpresszált

Szisztematikus név	Szimbólum	Gén	log2 (O29/O18)	O29/O18 p-érték	log2 (D29/D18)	D29/D18 p-érték	GO ID	GO (génontológiai) kifejezés	Bizonyíték	Hivatkozás, megjegyzés
FBgn0040487	BobA	Brother of Bearded A	-0,72	0,001513	-2,01	0,007206	GO:0042742	defense response to bacterium	IMP	PMID:18245331
FBgn0040487	BobA	Brother of Bearded A	-0,72	0,001513	-2,01	0,007206	GO:0016360	sensory organ precursor cell fate determination	IMP	PMID:10603347
FBgn0040487	BobA	Brother of Bearded A	-0,72	0,001513	-2,01	0,007206	GO:0001708	cell fate specification	IMP	PMID:10603347
FBgn0040487	BobA	Brother of Bearded A	-0,72	0,001513	-2,01	0,007206	GO:0007423	sensory organ development	IMP	PMID:10603347
FBgn0040487	BobA	Brother of Bearded A	-0,72	0,001513	-2,01	0,007206	GO:0007219	Notch signaling pathway	IMP	PMID:10603347
FBgn0038028	CG10035	CG10035	-2,31	0,001968	-4,36	0,009682	GO:0005575	cellular_component	ND	FB:FBrf0159398; expressed only during embryogenesis [FBrf0209115], Toll-pathway mediated [FBrf0151904]
FBgn0038028	CG10035	CG10035	-2,31	0,001968	-4,36	0,009682	GO:0003674	molecular_function	ND	FB:FBrf0159398
FBgn0038028	CG10035	CG10035	-2,31	0,001968	-4,36	0,009682	GO:0008150	biological_process	ND	FB:FBrf0159398
FBgn0028544	CG16884	CG16884	-0,95	0,004761	-3,43	0,002816	GO:0035220	wing disc development	IMP	FBrf0222340; larval trachea, hindgut; wing disc dev.
FBgn0032538	CG16885	CG16885	-1,44	0,004528	-3,62	0,000774	unknown	unknown		larval trachea
FBgn0036597	CG4962	CG4962	-1,49	0,006028	-3,65	0,000237	unknown	unknown		larval trachea
FBgn0030836	CG8664	CG8664	-1,30	0,000612	-2,46	0,001262	unknown	unknown		larval midgut; possible Dif co-regulator [FBrf0194397]
FBgn0027600	obst-B	obstructor-B	-1,92	0,007308	-2,95	0,000149	GO:0006030	chitin metabolic process	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0027600	obst-B	obstructor-B	-1,92	0,007308	-2,95	0,000149	GO:0008061	chitin binding	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0027600	obst-B	obstructor-B	-1,92	0,007308	-2,95	0,000149	GO:0008061	chitin binding	RCA	PMID:16325182
FBgn0027600	obst-B	obstructor-B	-1,92	0,007308	-2,95	0,000149	GO:0005576	extracellular region	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR002557
FBgn0027600	obst-B	obstructor-B	-1,92	0,007308	-2,95	0,000149	GO:0016490	structural constituent of peritrophic membrane	ISS	FB:FBrf0105495 EMBL:AF030431
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0005615	extracellular space	IDA	PMID:18666829

FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0005179	hormone activity	IEA	FB:FBrf0174215 InterPro:IPR012608
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0046662	regulation of oviposition	TAS	PMID:14504657
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0001664	G-protein coupled receptor binding	IPI	PMID:20308537 FB:FBgn0029768
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0007621	negative regulation of female receptivity	TAS	PMID:14504657
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0045434	negative regulation of female receptivity, post-mating	IMP	PMID:11846801
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0005576	extracellular region	NAS	FB:FBrf0124139
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	IDA	PMID:20308537
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0032504	multicellular organism reproduction	IEP	PMID:18666829
FBgn0250832	Dup99B	Ductus ejaculatorius peptide 99B	-2,71	0,00062	-1,52	0,00244	GO:0018991	oviposition	IMP	PMID:11846801

VI. táblázat A hőmérséklet hatása a vad típusú és a mutáns *DTS-L3/CyRoi* egyedek génexpressziójának változására. A $\log_2(O29/O18)$ a microarray kísérlet során az *OreR* (vad típus) 29 és 18°C-os minták normalizált jelerősség értékek arányainak kettes alapú logaritmus, míg a $\log_2(D29/D18)$ a *DTS-L3/CyRoi* mutánsok expresszióváltozását jelzi hasonló módon.

Kísérleti bizonyítékok: IDA: Inferred from Direct Assay, IPI: Inferred from Physical Interaction, IMP: Inferred from Mutant Phenotype, IGI: Inferred from Genetic Interaction, IEP: Inferred from Expression Pattern

Számítógépes elemzés: ISS: Inferred from Sequence or Structural Similarity, IGC: Inferred from Genomic Context, RCA: inferred from Reviewed Computational Analysis

Publikációkban megjelenő állítások: TAS: Traceable Author Statement, NAS: Non-traceable Author Statement

Kurátor által feltárt összefüggés: IC: Inferred by Curator, ND: No biological Data available

Automatikusan hozzárendelt: IEA: Inferred from Electronic Annotation

Szimbólum	Oligo ID	agy	fej	szem	TA-gangl.	nyálm.	gyomor	középbél	Malpighi	utóbél	szív	zsírtest	ovárium	here	jár. mir.	szűz spt.	spt.
AttA	1625124_at		+													++	+
AttA	1627551_s_at		++	++							+	+				++	+
AttC	1641419_at		++	++					+	+	++	++				++	++
CG10154	1623226_at																+
CG10725	1638716_a_at							++									
CG17234	1623211_at															++	++
CG31091	1626201_at							++									
CG8303	1636759_at						+			+			+		++		
CG9825	1629164_at							+						+			
Dpt	1640022_at																
DptB	1638235_at		++	++							+	++				++	++
Gnmt	1634551_at		+	+						+	++	++				++	++
LysX	1632720_at							++		++							
Mtk	1627613_at	+	++	++			+		+	+	++	++				++	++
PGRP-SB1	1636490_at		++	++					+	+	++	++				++	++
vanin-like	1636507_at							++	+	++							
CG13043	1641729_at																
CG5770	1632531_at							++									
His3:CG33830	1626867_at					+							+				+
His3:CG33842	1638308_s_at					+	+			+		+	+			+	+
Hsp22	1629061_s_at			+			+		++		+		+				
Hsp22	1630487_s_at								+					++			
BobA	1628084_at																
BobA	1637569_s_at																
CG10035	1636782_at																
CG16884	1635483_at																
CG16885	1631302_at			+													
CG16885	1638475_a_at																
CG4962	1623517_at		+	+													
CG8664	1636618_at																
Dup99B	1639365_at														++		
obst-B	1641109_at																

VII. táblázat A hőmérséklet hatása a vad típusú és a mutáns *DTS-L3/CyRoi* genotípusú egyedek megváltozó expressziójú génjei, illetve azok szervspecifikus kifejeződése kifejtett, vad típusú állatban (forrás: FlyAtlas expression data). TA-gangl.: thoraco-abdominalis ganglion; nyálm.: nyálmirigy; jár. mir.: járulékos mirigyek; spt.: spermátéka; közepes expr.: + ; magas és nagyon magas expr.: ++

Génontológia kategória (biol. folyamat)	Ref. tal.	Találatok	Várt találatok	Gyak. eltérés	+/-	P-érték	Korr. P-érték
antibacterial humoral response	30	5	0,11	47,39	+	8,19E-08	2,26E-04
antimicrobial humoral response	75	6	0,26	22,75	+	2,81E-07	7,74E-04
humoral immune response	96	6	0,34	17,77	+	1,17E-06	3,22E-03
immune response	200	7	0,70	9,95	+	6,41E-06	1,77E-02
defense response to Gram-positive bacterium	42	4	0,15	27,08	+	1,57E-05	4,34E-02
defense response	341	8	1,20	6,67	+	2,39E-05	-
cellular metabolic process	3240	1	11,39	< 0,2	-	3,81E-05	-
single-organism process	5774	7	20,31	0,34	-	4,35E-05	-
defense response to bacterium	185	6	0,65	9,22	+	4,72E-05	-
immune system process	297	7	1,04	6,70	+	7,89E-05	-
response to external biotic stimulus	311	7	1,09	6,40	+	1,05E-04	-
response to other organism	311	7	1,09	6,40	+	1,05E-04	-
response to bacterium	215	6	0,76	7,94	+	1,07E-04	-
response to biotic stimulus	313	7	1,10	6,36	+	1,09E-04	-
defense response to other organism	229	6	0,81	7,45	+	1,51E-04	-
primary metabolic process	3594	3	12,64	0,24	-	4,31E-04	-
regulation of cellular process	3084	2	10,85	< 0,2	-	5,33E-04	-
regulation of biological process	3326	3	11,70	0,26	-	1,12E-03	-
cellular developmental process	2336	1	8,22	< 0,2	-	1,37E-03	-
biological regulation	3669	4	12,90	0,31	-	1,44E-03	-
cell differentiation	2256	1	7,93	< 0,2	-	1,85E-03	-
aminoglycan metabolic process	153	4	0,54	7,43	+	2,08E-03	-
sarcosine biosynthetic process	1	1	0,00	> 100	+	3,51E-03	-
sulfur compound catabolic process	1	1	0,00	> 100	+	3,51E-03	-
S-adenosylmethionine catabolic process	1	1	0,00	> 100	+	3,51E-03	-
developmental process	3341	4	11,75	0,34	-	4,19E-03	-
response to stress	1091	10	3,84	2,61	+	4,21E-03	-
single-organism developmental process	3316	4	11,66	0,34	-	4,54E-03	-
defense response to Gram-negative bacterium	95	3	0,33	8,98	+	4,63E-03	-
localization	1980	1	6,96	< 0,2	-	5,03E-03	-
protein metabolic process	1938	1	6,82	< 0,2	-	5,84E-03	-
anatomical structure development	3217	4	11,31	0,35	-	6,17E-03	-
coenzyme catabolic process	2	1	0,01	> 100	+	7,01E-03	-
system development	2288	2	8,05	0,25	-	8,62E-03	-
chitin metabolic process	124	3	0,44	6,88	+	9,58E-03	-
wax biosynthetic process	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
S-adenosylmethionine cycle	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
sarcosine metabolic process	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
S-adenosylhomocysteine metabolic process	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
cofactor catabolic process	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
wax metabolic process	3	1	0,01	94,78	+	1,05E-02	-
response to external stimulus	875	8	3,08	2,60	+	1,08E-02	-

glucosamine-containing compound metabolic process	131	3	0,46	6,51	+	1,11E-02	-
amino sugar metabolic process	132	3	0,46	6,46	+	1,13E-02	-
anatomical structure morphogenesis	1734	1	6,10	< 0,2	-	1,19E-02	-
S-adenosylmethionine metabolic process	4	1	0,01	71,08	+	1,40E-02	-
establishment of localization	1636	1	5,75	< 0,2	-	1,66E-02	-
sulfur amino acid metabolic process	5	1	0,02	56,87	+	1,74E-02	-
organic substance metabolic process	3942	7	13,86	0,50	-	1,75E-02	-
multicellular organism development	2858	4	10,05	0,40	-	1,78E-02	-
cellular nitrogen compound metabolic process	1605	1	5,64	< 0,2	-	1,84E-02	-
multicellular organismal process	4229	8	14,87	0,54	-	2,00E-02	-
transport	1573	1	5,53	< 0,2	-	2,05E-02	-
single-multicellular organism process	3168	5	11,14	0,45	-	2,09E-02	-
metabolic process	4381	9	15,41	0,58	-	3,08E-02	-
antifungal humoral response	10	1	0,04	28,43	+	3,46E-02	-
organic cyclic compound metabolic process	1396	1	4,91	0,20	-	3,67E-02	-
macromolecule metabolic process	2949	5	10,37	0,48	-	3,70E-02	-
carbohydrate derivative metabolic process	528	5	1,86	2,69	+	3,75E-02	-
chaperone-mediated protein folding	11	1	0,04	25,85	+	3,80E-02	-
reproduction	1384	1	4,87	0,21	-	3,82E-02	-
cellular aromatic compound metabolic process	1351	1	4,75	0,21	-	4,24E-02	-
protein refolding	13	1	0,05	21,87	+	4,47E-02	-
oviposition	13	1	0,05	21,87	+	4,47E-02	-
serine family amino acid metabolic process	14	1	0,05	20,31	+	4,81E-02	-
heterocycle metabolic process	1304	1	4,59	0,22	-	4,93E-02	-

VIII. Táblázat A génontológiai elemzés során kapott alul- és felülreprezentált biológiai folyamatok kategóriái a VI. táblázat génlistájának felhasználásával; *Ref. tal.*: Az adott génontológiai kategóriába tartozó *Drosophila melanogaster* gének száma a PANTHER adatbázisában; *Találatok*: találatok száma a VI. táblázat génlistájából; *Gyak. eltérés*: Gyakoriság eltérés a várt és a kapott gyakoriságértékek között; +/-: az eltérés iránya, előjele; *P-érték*: A Bonferroni-korrekció előtti P-érték; *Korr. P-érték*: A Bonferroni-korrekció után kapott P-érték; A szürkével kiemelt első öt kategória állta ki a post-hoc korrekció próbáját. Ezen kategóriák kivétel nélkül az immunrendszer működésének intenzifikálódására utalnak.

Génontológia kategória (molek. funkció)	Ref. tal.	Találatok	Várt találatok	Gyak. eltérés	+/-	P-érték
structural constituent of peritrophic membrane	23	3	0,08	37,09	+	7,84E-05
binding	4959	30	17,44	1,72	+	2,52E-04
glycine N-methyltransferase activity	1	1	0,00	> 100	+	3,51E-03
pantetheine hydrolase activity	1	1	0,00	> 100	+	3,51E-03
chitin binding	113	3	0,40	7,55	+	7,45E-03
long-chain-fatty-acyl-CoA reductase activity	4	1	0,01	71,08	+	1,40E-02
catalytic activity	3992	7	14,04	0,50	-	1,53E-02
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides	61	2	0,21	9,32	+	1,97E-02
ion binding	1378	1	4,85	0,21	-	3,89E-02
cation binding	1337	1	4,70	0,21	-	4,44E-02
metal ion binding	1327	1	4,67	0,21	-	4,58E-02
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	97	2	0,34	5,86	+	4,60E-02
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity	14	1	0,05	20,31	+	4,81E-02

IX. Táblázat A génontológiai elemzés során kapott alul- és felülreprezentált molekuláris funkciók kategóriái a VI. táblázat génlistájának felhasználásával Bonferroni-korrekció nélkül; *Ref. tal.*: Az adott génontológiai kategóriába tartozó *Drosophila melanogaster* gének száma a PANTHER adatbázisában; *Találatok*: találatok száma a VI. táblázat génlistájából; *Gyak. eltérés*: Gyakoriság eltérés a várt és a kapott gyakoriságértékek között; +/-: az eltérés iránya, előjele; *P-érték*: A Bonferroni-korrekció előtti P-érték; A Bonferroni post-hoc teszt elvégzése után egyetlen kategória sem maradt a listában.